

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DITELURETO DE DIFENILA INDUZ PREJUÍZOS NO  
DESENVOLVIMENTO, NEUROTOXICIDADE E  
DESMIELINIZAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL  
DE FILHOTES DE RATOS WISTAR**

DISSERTAÇÃO

**Simone Pinton**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**Novembro de 2009.**

**DITELURETO DE DIFENILA INDUZ PREJUÍZOS NO  
DESENVOLVIMENTO, NEUROTOXICIDADE E  
DESMIELINIZAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL  
DE FILHOTES DE RATOS WISTAR**

**por**

**Simone Pinton**

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

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Wayne Nogueira**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**Novembro de 2009.**

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

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

**DITELURETO DE DIFENILA INDUZ PREJUÍZOS NO DESENVOLVIMENTO,  
NEUROTOXICIDADE E DESMIELINIZAÇÃO NO SISTEMA NERVOSO  
CENTRAL DE FILHOTES DE RATOS WISTAR**

Elaborada por  
**Simone Pinton**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

**Cristina Wayne Nogueira, Dr<sup>a</sup>.** (Orientadora)

---

**Cíntia Melazzo de Andrade Mazzanti, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)

---

**Mauro Schneider Oliveira, Dr.** (UFSM)

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**Novembro de 2009.**

*Para Aquela Que Sempre Foi*

*Meu Apoio,*

*Minha Referência,*

*Meu Espelho.*

*A minha Mãe Paula,*

*Com Todo o Meu Amor.*

## AGRADECIMENTOS

São tantas as pessoas, e tanto, que quero eu agradecer, que não sei nem por onde começar, pessoas que foram importantes para a minha vida e para a minha formação, gostaria de agradecer a todos pela amizade, coleguismo, parceria, carinho, paciência, dedicação...

Mas como preciso começar, e não poderia ser diferente, começo pela minha família, que é o suporte de tudo, que se manteve sempre unida, e esteve ainda mais unida nos momentos mais difíceis. Quero agradecer à minha mãe, pela dedicação, pelo sacrifício, por sempre ter tido coragem e bravura para seguir em frente, por nunca ter se entregado. Eu te amo muito e sou muito grata por tudo que fizestes por mim. Agradeço também, imensamente às minhas irmãs, Patrícia e Juliana, ao Haeckel (meu sobrinho único, e o favorito) e ao Giovane, pelo apoio e amor dedicados por toda a vida, obrigada por estarem sempre por perto, em quaisquer circunstâncias. Quero agradecer ao Duda, por ter aparecido na minha vida, e por tê-la transformado. Você e eu sabemos bem, a importância que tivestes na conclusão desta etapa, obrigada por me acompanhar, por me incentivar, por me aconselhar, por ficar acordado ao meu lado nas noites que eu precisava ficar acordada até tarde, estudando, preparando seminário... Eu te amo por isso e por várias outras coisas.

Não me canso de agradecer a minha orientadora, Cristina, se ainda não ficou claro, quero deixar registrado a minha enorme gratidão. Obrigada por ter acreditado em mim, por ter me guiado e cobrado sempre o melhor. Admiro-te pela sabedoria, dedicação, esforço, competência e carinho que você dedica a tudo que faz. Obrigada pela compreensão e amizade.

Agora chega de chororô, vou agradecer aquelas que me acompanham há muitos anos e não são (ou foram) apenas colegas de trabalho, são “minhas amigas de fé, irmãs, camaradas”. Agradeço à Marina, Eluza, Daiana, Ana e em especial à Cristiane (você é fora do normal). Obrigada pelo trabalho diário, pela colaboração em trabalhos, pelos jantares, festas e cervejas geladas no bar (kkk...).

Obrigada Juliana, durante todo o mestrado você foi minha grande parceira, foi ótimo ter convivido contigo e construído esta nova e grande amizade, que eu sei, se estenda não só pelo doutorado, mas sim por toda a vida.

Aiaiai, não aguento mais escrever e ainda falta tanta gente... Bibi, obrigada por tudo, te adoro, tu és uma grande amiga. Aninha, Carmine, Ethel, Cristiano, Ricardo,

Silvane e Michael, obrigada pelo apoio, ensinamentos, amizade, paciência... Vocês sempre foram pessoas que eu pude e sei que sempre poderei contar, obrigada por serem tão bons colegas.

Agradeço muito aos ICs, sem vocês o trabalho não seria tão dinâmico e divertido, embora nós (PGs) tenhamos a função de lhes co-orientar e ensinar algumas coisas, são vocês que nos ensinam muito mais. Além disso, quero agradecer particularmente ao César (por ser tão perfeccionista), Marlon (por ser um chato e desconstrair o ambiente com tuas aporrinhações), Crisinha (pelo exemplo de dedicação), Xorão (por ser meu primeiro IC, obrigada por ter me acompanhado), Carlinha (pelo humor, e pelo cuidado que você tem com os outros), Maurício (pelos origamis) e Pietro (pela motivação). Todos vocês tem colaboração neste trabalho.

Ao Professor Gilson e a todos os seus alunos, Flávia, Carol, Adri, Behur, Ricardo, Dani, Maneco, Juliano, Cirilo, Anderson, Zé Neto, Boliviano e Rafaela, e ao Letiére, obrigada pelos compostos sintetizados e pelas conversas e cafés no corredor.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup> João, Prof<sup>o</sup> Félix e Prof<sup>a</sup> Nilda, por todos os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional. Assim como agradeço, à todos os seus alunos, obrigada por sempre estarem dispostos a me ajudar e auxiliar no que me foi necessário.

Aos docentes do curso de pós-graduação em Bioquímica Toxicológica da UFSM pelos ensinamentos.

A todos os funcionários, em especial à Angélica e a Silvane, secretárias da Pós-graduação pela paciência, carinho e boa vontade com que resolvem todos os nossos problemas.

Ao Rinaldo pelo cuidado com os animais.

Agradeço, enfim, à Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade, e à Capes pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DAS ILUSTRAÇÕES	xii
ABREVIATURAS E SIMBOLOGIAS	xiv
<b>PARTE I.....</b>	<b>01</b>
1.1. INTRODUÇÃO.....	02
1.2. OBJETIVOS.....	04
1.2.1. Objetivo Geral.....	04
1.2.2. Objetivos Específicos.....	04
<b>PARTE II.....</b>	<b>05</b>
2.2. REVISÃO DA LITERATURA.....	06
2.2.1. Desenvolvimento Pós-natal.....	06
2.2.2. Análise Comportamental Durante o Desenvolvimento Pós-natal.....	08
2.2.2.1. Campo aberto (“Open-field”).....	08
2.2.2.2. Geotaxia negativa (“Negative geotaxis”).....	08
2.2.2.3. Sustentação na barra (“Forelimb support”).....	09
2.2.3. Mielina.....	10
2.2.4. Desmielinização.....	11
2.2.5. Doenças Desmielinizantes.....	12
2.2.6. Modelos de Desmielinização.....	13
2.2.7. Telúrio.....	13
2.2.7.1. Propriedades Toxicológicas do Telúrio.....	14
2.2.7.2. Desmielinização Induzida pelo Telúrio.....	15

2.2.7.3. Ditelureto de difenila.....	16
2.2.8. Acetilcolinesterase (AChE) .....	17
<b>PARTE III.....</b>	<b>19</b>
3. RESULTADOS.....	20
<b>PARTE IV.....</b>	<b>51</b>
4. DISCUSSÃO.....	52
<b>PARTE V.....</b>	<b>57</b>
5. CONCLUSÕES.....	58
<b>PARTE VI.....</b>	<b>59</b>
6. PESPECTIVAS.....	60
<b>PARTE VII.....</b>	<b>61</b>
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>74</b>
Demais trabalhos desenvolvidos durante o Curso de Mestrado.....	74

## APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é constituída de sete partes:

**Parte I:** Introdução e Objetivos.

**Parte II:** Revisão da literatura.

**Parte III:** Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob forma de manuscrito, subdivido em introdução, resultados, discussão, materiais e métodos e referências.

**Parte IV:** Discussão final.

**Parte V:** Conclusões.

**Parte VI:** Perspectivas.

**Parte VII:** Referências, as quais referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução, revisão da literatura e discussão desta dissertação.

## RESUMO

Dissertação

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica

Universidade Federal de Santa Maria

### **Ditelureto de difenila induz prejuízos no desenvolvimento, neurotoxicidade e desmielinização no sistema nervoso central de filhotes de ratos wistar**

AUTORA: SIMONE PINTON

ORIENTADORA: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 20 de novembro de 2009.

O objetivo geral deste estudo foi investigar se a mielinogênese está envolvida no mecanismo pelo qual o ditelureto de difenila [(PhTe)<sub>2</sub>] exerce toxicidade em filhotes de ratos. O presente estudo avaliou a performance comportamental durante o desenvolvimento pós-natal está relacionada ao processo de desmielinização induzida por (PhTe)<sub>2</sub> em filhotes de ratos Wistar. A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi realizada no córtex cerebral dos filhotes de ratos, uma vez que estudos têm demonstrado que os eventos desmielinizantes podem interferir na atividade desta enzima. Os filhotes de ratos receberam uma única injeção subcutânea de (PhTe)<sub>2</sub> (0,25 µmol/kg) ou veículo (óleo de canola) no 14º dia pós-natal (PND). E após a exposição ao (PhTe)<sub>2</sub>, a performance comportamental dos animais foi avaliada nos testes da geotaxia negativa, da sustentação na barra e do campo aberto, estes ensaios foram realizados do 1º ao 7º dia (PND 15 a 21) após a injeção do composto. Diariamente e imediatamente após estes testes comportamentais, os filhotes foram submetidos à eutanásia (do 1º ao 7º dia), e as amostras de tecidos recolhidas para a quantificação da densidade de mielina encefálica e análises histológicas. O aparecimento de sinais clássicos de toxicidade, alterações comportamentais e desmielinização do sistema nervoso central (SNC) foi dependente do tempo após a exposição ao (PhTe)<sub>2</sub> em filhotes de ratos. O dano neuronal, revelado pela análise histológica, e o aumento na atividade da AChE ocorreu nos dias 4 e 5 após a exposição ao (PhTe)<sub>2</sub>, que é coincidente com o período crítico de desmielinização. Em conclusão, a exposição ao (PhTe)<sub>2</sub> induz um prejuízo no desenvolvimento, neurotoxicidade e desmielinização do SNC de filhotes de ratos.

**Palavras-chave:** Telúrio, Desenvolvimento, Desmielinização, Neurotoxicidade, Acetilcolinesterase, Ditelureto de difenila.

## ABSTRACT

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

### **Diphenyl ditelluride induces impairment developmental behavioral, neurotoxicity and demyelination in central nervous system of rat pups**

AUTHOR: SIMONE PINTON

ADVISOR: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA

Place and Date of the defense: Santa Maria, November, 20<sup>th</sup> 2009.

The purpose of this study was to investigate if myelinogenesis is related to the mechanism by which diphenyl ditelluride [(PhTe)<sub>2</sub>] causes toxicity in rat pups. The present study was performed to examine whether the behavioral performance is related to demyelination process induced by (PhTe)<sub>2</sub> in rat pups. Acetylcholinesterase (AChE) activity was carried out in cerebral cortex of rat pups since studies have demonstrated that demyelinating events interfere with the activity of this enzyme. Rat pups received a single subcutaneous injection of (PhTe)<sub>2</sub> (0,25 µmol/kg) or vehicle (canola oil) at 14<sup>th</sup> post natal day (PND). From day 1 to 7 (PND 15 to 21) after exposure, negative geotaxis, forelimb support and open field tests were performed in pups. Rat pups were euthanized daily (from day 1 to 7) immediately after the behavioral tests. The cerebral density of myelin and histological analysis were performed. The appearance of classic signs of toxicity, behavioral alterations and demyelination of CNS was dependent of the time after (PhTe)<sub>2</sub> exposure to rat pups. Neuronal damage, revealed by histological analysis, and the increase in AChE activity occurred at 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> day after (PhTe)<sub>2</sub> exposure, which is coincident with the critical period of demyelination. In conclusion, exposure to (PhTe)<sub>2</sub> induced an impairment of developmental behavioral, neurotoxicity and demyelination in the central nervous system of rat pups.

**Key-words:** Tellurium, Developmental Behavioral, Demyelination, Neurotoxicity, Acetylcholinesterase, Diphenyl ditelluride.

## LISTA DAS ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1:** Curva de Velocidade, comparando os índices relativos, duração e tempo do processo desenvolvimental específico em cérebro de ratos e humanos.....07
- Figura 2:** Teste da geotaxia negativa.....09
- Figura 3:** Teste da sustentação na barra.....09
- Figura 4:** Neurônio mielinizado. (A) Figura meramente ilustrativa; (B) Microscopia eletrônica de um corte transversal de nervo ciático de rato.....10
- Figura 5:** Axônio desmielinizado. (A) Figura ilustrativa de um neurônio com a bainha de mielina normal e com a membrana de mielina lesionada; (B) Microscopia eletrônica de um corte transversal de nervo ciático de rato.....11
- Figura 6:** Biossíntese do colesterol.....16
- Figura 7:** Estrutura química da ditelureto de difenila.....17

### RESULTADOS

**(Manuscrito - Diphenyl ditelluride induces impairment developmental behavioral, neurotoxicity and demyelination in central nervous system of rat pups)**

- Figure 1:** Experimental protocol.....43
- Figure 2:** Effect of (PhTe)<sub>2</sub> on the body weight gain of rat pups.....44
- Figure 3:** Effect of (PhTe)<sub>2</sub> on the negative geotaxis test of rat pups.....45
- Figure 4:** Effect of (PhTe)<sub>2</sub> on forelimb support test of rat pups.....46

<b>Figure 5:</b> Effect of (PhTe) <sub>2</sub> on AChE activity in cerebral cortex of rat pups.....	47
<b>Figure 6:</b> Effect of (PhTe) <sub>2</sub> on myelin density of rat pups.....	48
<b>Figure 7:</b> Photomicrography of brain, cerebellum and spinal cord showed different degrees of injury with detail on the right.....	49
<b>Figure 8:</b> Photomicrography of the cerebellar white matter.....	50

## ABREVIATURAS E SIMBOLOGIAS

**ACh** - Acetilcolina

**AChE** - Acetilcolinesterase

**AChEIs** - Inibidores da Acetilcolinesterase

**DNA** - Ácido Desoxirribonucléico

**DW** - Degeneração Walleriana

**EM** - Esclerose Múltipla

**GBS** - Síndrome de Guillain-Barré

**HE** - Haematoxilina-eosina

**Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> - ATPase** - Sódio potássio adenosina trifosfatase

**NPD** - Dia pós-natal

**(PhTe)<sub>2</sub>** - Ditelureto de Difenila

**SH** - Grupamento tiol

**SNC** - Sistema Nervoso Central

**SNP** - Sistema Nervoso Periférico

**Te** - Telúrio

**Te<sup>-2</sup>** - Telureto

**Te<sup>0</sup>** - Telúrio Elementar

**Te<sup>+4</sup>** - Telurito

**Te<sup>+6</sup>** - Telurato

# **PARTE I**

---

## 1.1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento cerebral inclui a síntese de componentes celulares em paralelo à neurogênese, gliogênese e à diferenciação celular com aumento no tamanho da célula (Morgane e col., 2002). A maturação do sistema nervoso central (SNC) e o desenvolvimento da capacidade cognitiva dependem de três fatores essenciais: potencial genético do indivíduo, estimulação ambiental e nutrição adequada.

O cérebro de roedores apresenta rápido desenvolvimento após o nascimento, caracterizado por uma intensa síntese de componentes celulares, sendo que, a mielinização, no rato, se dá principalmente nas três semanas iniciais de vida, quando declina abruptamente aos níveis adultos. O processo de mielinização tem uma relação direta com a aprendizagem e o comportamento motor. As diferentes áreas do córtex não sofrem mielinização homogênea. As regiões corticais com mielinização precoce controlam movimentos relativamente simples ou análises sensoriais, enquanto as áreas com mielinização tardia controlam as funções mentais elevadas. Com isso, pode-se afirmar que a mielinização funciona como um índice aproximado da maturação cerebral (Kolb & Wishaw, 2002).

Sendo o cérebro, susceptível à influência de fatores ambientais durante este período de maturação, o desenvolvimento de modelos animais de desmielinização pós-natal é uma importante ferramenta para prospectivas estratégias terapêuticas. A desmielinização no sistema nervoso pode ocorrer devido a uma variedade de condições patológicas, incluindo intoxicações, desordens metabólicas e nutricionais, infecções virais, trauma mecânico e inflamação (Hauw e col., 1992), prejudicando assim a transmissão do impulso nervoso, implicando no aparecimento de diversos distúrbios neurológicos.

Numerosos modelos experimentais que mimetizam a fisiopatologia do processo de desmielinização têm sido desenvolvidos, entre eles está o uso do telúrio como agente desmielinizante. Diversos autores reportaram que roedores intoxicados por telúrio (Te) elementar desenvolveram uma neuropatia periférica no período ativo da mielinogênese (Duckett e col., 1979; Harry e col., 1989; Lampert e col., 1970) afetando a transcrição das proteínas de mielina em nível de gene (Morell e col., 1994; Toews e col., 1997) e inibindo a síntese do colesterol (Lampert & Garrett, 1971) um dos principais lipídeos que constituem as membranas de mielina.

Estudos experimentais demonstraram que o ditelureto de difenila [(PhTe)<sub>2</sub>] possui potencial toxicológico em modelos animais (Nogueira e col., 2004). Nosso grupo de pesquisa

obteve resultados que indicaram que o  $(\text{PhTe})_2$  é um composto neurotóxico em ratos e camundongos (Nogueira e col., 2001; 2002; Moretto e col., 2003). Além disso, a exposição ao  $(\text{PhTe})_2$  altera parâmetros comportamentais relacionados com funções neurais em ratos jovens (Stangherlin e col., 2006) e é teratogênico em fetos de ratos (Stangherlin e col., 2005; Roman e col., 2007). Entretanto, considerando-se que não está claro na literatura o mecanismo pelo qual o  $(\text{PhTe})_2$  apresenta toxicidade, há a necessidade de novos estudos experimentais que investiguem o mecanismo de toxicidade do  $(\text{PhTe})_2$ , bem como seus efeitos neurocomportamentais em ratos durante a fase de desenvolvimento pós-natal.

Neste contexto, este estudo visou investigar se a mielinogênese está envolvida no mecanismo de toxicidade do  $(\text{PhTe})_2$  em filhotes de ratos e se a intoxicação com o  $(\text{PhTe})_2$  consistiria em um modelo experimental de desmielinização.

## **1.2. OBJETIVOS**

### **1.2.1. Objetivo Geral**

Considerando-se que não está claro na literatura o mecanismo pelo qual o  $(\text{PhTe})_2$  apresenta toxicidade em filhotes de ratos, o objetivo geral deste estudo foi investigar se a mielinogênese está envolvida no mecanismo de toxicidade do  $(\text{PhTe})_2$  em filhotes de ratos a partir do 14º dia após o nascimento (14 PND). Desta forma, nosso objetivo foi averiguar se a intoxicação com o  $(\text{PhTe})_2$  consistiria em um modelo experimental de desmielinização.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

1. Observar sinais de toxicidade induzidos pelo  $(\text{PhTe})_2$  nos filhotes de ratos diariamente, durante um período de 7 dias após a exposição ao composto;
2. Verificar se a exposição ao  $(\text{PhTe})_2$  alterará parâmetros comportamentais relacionados com a atividade e o desenvolvimento das capacidades sensorio-motoras destes ratos;
3. Quantificar a densidade de mielina no encéfalo de filhotes de ratos expostos ao  $(\text{PhTe})_2$ ;
4. Avaliar histologicamente o efeito do  $(\text{PhTe})_2$  no cérebro, nas substâncias branca e cinzenta do cerebelo e da medula espinhal em filhotes de ratos;
5. Determinar a atividade da enzima acetilcolinesterase no córtex cerebral dos filhotes de ratos expostos ao  $(\text{PhTe})_2$ .

## **PARTE II**

---

## **2.2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.2.1. Desenvolvimento Pós-natal**

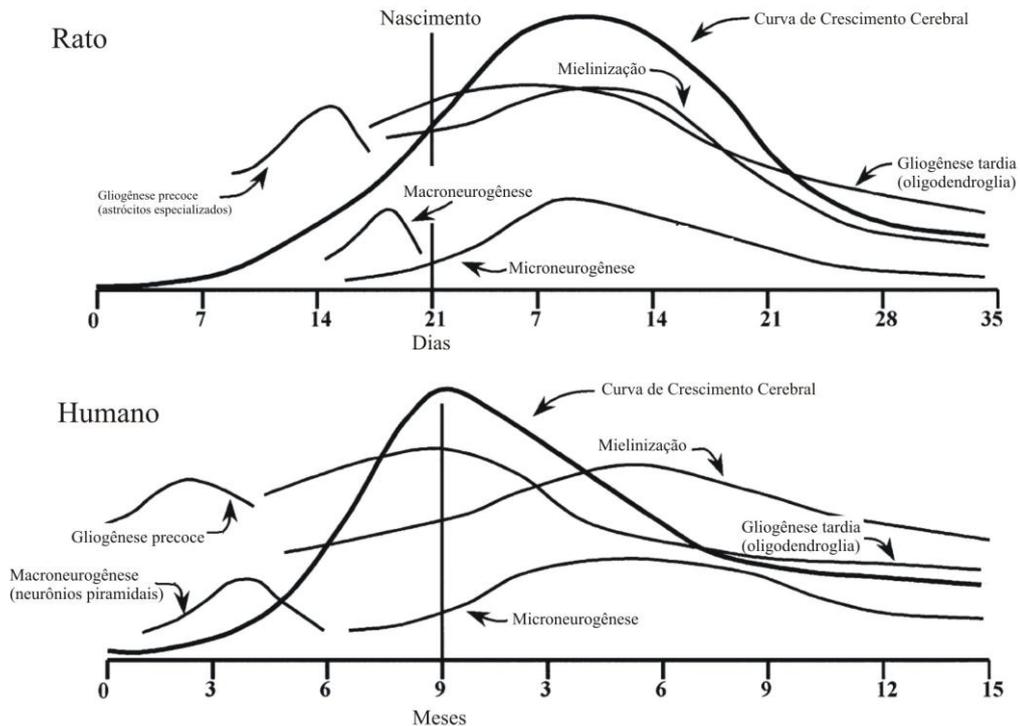
O desenvolvimento cerebral inclui a síntese de componentes celulares em paralelo à neurogênese, gliogênese e à diferenciação celular com aumento no tamanho da célula (Morgane e col., 2002). A maturação do SNC e o desenvolvimento da capacidade cognitiva dependem de três fatores essenciais: potencial genético do indivíduo, estimulação ambiental e nutrição adequada.

Seguindo esta mesma linha de pensamento, o desenvolvimento motor também é viabilizado tanto pelo processo evolutivo biológico quanto pelo social, uma vez que a maturação da motricidade é uma contínua alteração no comportamento ao longo da vida, que acontece por meio das necessidades de se realizar tarefas, da biologia do indivíduo e o ambiente em que ele vive. Desta forma, considera-se que uma evolução neural proporciona uma evolução ou integração sensório-motora que acontece por meio do SNC em operações cada vez mais complexas (Fonseca, 1988).

Todo o comportamento envolve processos neurais específicos, que ocorrem desde a percepção do estímulo até a efetivação da resposta selecionada. Esses processos neurais possibilitam o comportamento e o aprendizado, que acontecem de maneiras diferentes no cérebro, a maturação do sistema nervoso possibilita o aprendizado progressivo de habilidades. À medida que uma determinada área cerebral amadurece, há o aparecimento ou aperfeiçoamento dos comportamentos correspondentes àquela área madura, desde que tal função seja estimulada.

Desta forma, o desenvolvimento comportamental é restringido pela síntese e maturação das células nervosas, como exemplo, considera-se que embora as crianças sejam capazes de fazer movimentos complexos, os níveis de coordenação e controle motor fino só serão alcançados após o término da formação da mielina, na adolescência (Kolb & Whishaw, 2002). Em roedores e humanos, algumas etapas do desenvolvimento cerebral ocorrem em períodos diferentes (fig. 1). No rato, a hiperplasia neuronal prevalece na vida pré-natal, ocorrendo principalmente durante a última semana de gestação (Dobbing & Sands, 1971). A neurogênese pós-natal é pequena quantitativamente, com produção de microneurônios com axônios curtos, especialmente no córtex cerebelar e hipocampo (Altman & Das, 1966; Croskerry e col., 1973). As células gliais apresentam proliferação pós-natal principalmente, ocorrendo durante o período de lactação (Fig. 1). A mielinização, no rato, se dá

principalmente nas semanas iniciais de vida, quando declina abruptamente aos níveis adultos (Davidson & Dobbing, 1966). A sinaptogênese no cérebro do rato ocorre principalmente entre o 7º e 21º dia de vida pós-natal, podendo diferir de região a região. O aumento nos contatos sinápticos e a diferenciação destas conexões representam o começo do desenvolvimento químico e funcional do SNC.



**Figura 1:** Curva de Velocidade, comparando os índices relativos, duração e tempo do processo desenvolvimental específico em cérebro de ratos e humanos. As curvas de rápido crescimento cerebral (índices de mudança no peso cerebral) são sobrepostas em relação aos eventos desenvolvimentais no cérebro. Note que a gênese precoce de astroglia e células piramidais em humanos, resultando na aquisição de aproximadamente 27% do peso cerebral adulto no tempo do nascimento, comparado a aproximadamente 12% do peso cerebral adulto visto em ratos ao nascimento. A curva de rápido crescimento cerebral em ratos é alterada para a direita, comparado aos humanos (Morgane e col., 2002).

Sendo assim, o cérebro de roedores apresenta rápido desenvolvimento após o nascimento caracterizado por uma intensa síntese de proteínas e de DNA (Gottlieb e col., 1977). Desse modo, o cérebro é sensível a alterações no seu desenvolvimento, provocadas por fatores externos durante os períodos de rápido crescimento cerebral, após o nascimento (Annau & Cuomo, 1988; Rice, 1999; Rocinholi e col., 1997). Os dois maiores tipos de desordens envolvendo o desenvolvimento do SNC são: patologias causadas por lesões ou

agentes tóxicos (resultando em processos destrutivos, com rápido crescimento e diferenciação) e desordens causadas por nutrição inadequada, considerando que nutrientes em quantidades apropriadas são essenciais para a formação celular e organização tecidual (Morgane e col., 2002).

### **2.2.2. Análise Comportamental Durante o Desenvolvimento Pós-natal**

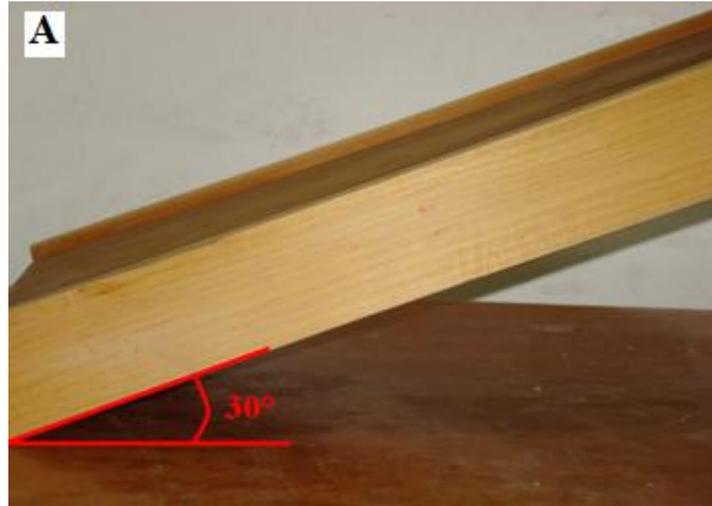
O funcionamento normal do sistema nervoso pode ser alterado pela ação de xenobióticos durante todas as fases do desenvolvimento. Essas alterações podem ser avaliadas pelo desempenho dos animais em vários testes comportamentais (Genn e col., 2003; Graeff e col., 1998; Lalonde e col., 2003), que são as manifestações finais das funções neurais.

#### **2.2.2.1. Campo aberto (“Open-field”)**

O teste do campo aberto é uma medida da atividade motora espontânea e atividade exploratória dos animais. O aparato consiste em uma arena quadrada (45 x 45 cm) dividida em nove quadrantes. Cada animal é colocado individualmente no centro da arena e o número de segmentos atravessados (com todas as patas) é registrado durante um período de quatro minutos. Esse procedimento é repetido no dia seguinte. A exploração é um comportamento muito importante, onde o animal capta informações a respeito do ambiente que o cerca. As informações adquiridas são essenciais para a preservação da vida desse animal (Sutherland & Rudy, 1989).

#### **2.2.2.2. Geotaxia negativa (“Negative geotaxis”)**

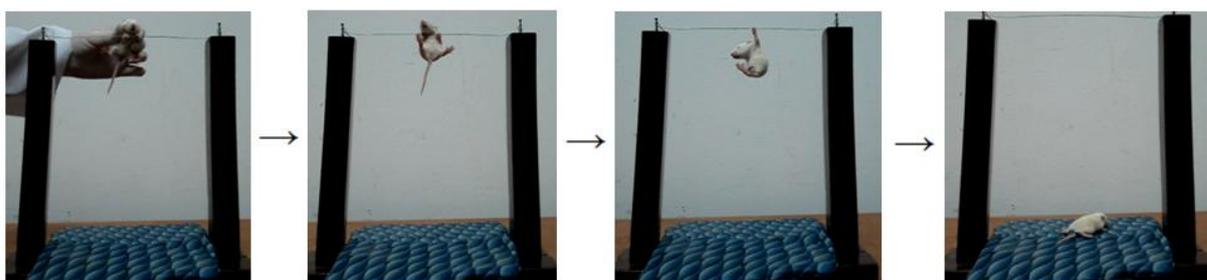
O teste da geotaxia negativa é realizado sobre uma plataforma plana e inclinada, com um ângulo de 30° em relação ao chão (fig. 2). Este teste consiste em colocar o filhote nesta rampa, com as quatro patas na superfície da mesma, com a cabeça direcionada para o chão, o que seria uma posição desconfortável para o animal. O tempo gasto para o filhote corrigir sua posição corporal (dar um giro de 180°) é cronometrado. Neste teste são avaliados os reflexos da função vestibular, além da atividade e desenvolvimento motor (Crozier & Pincus, 1926).



**Figura 2:** Teste da geotaxia negativa, (A) aparato usado para o teste e (B) a performance em sequência.

### 2.2.2.3. Sustentação na barra (“Forelimb support”)

No teste da sustentação na barra os animais são colocados em uma barra horizontal (1 mm de diâmetro) a 47 cm de altura, se sustentando nesta barra com as patas dianteiras, como demonstrado na figura 3. O tempo em que os animais conseguirem se fixar na barra é cronometrado, como uma medida de força muscular (Fox 1965).



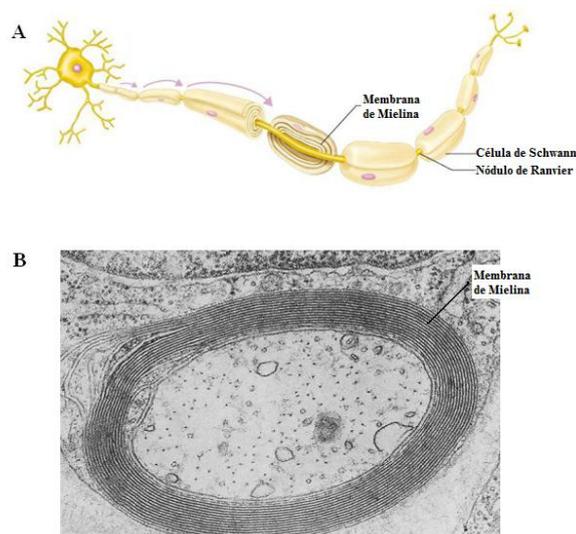
**Figura 3:** Teste da sustentação na barra.

### 2.2.3. Mielina

A mielina é uma estrutura membranosa lipo-protéica característica do tecido nervoso produzida por certos tipos de gliócitos. No SNP a membrana de mielina é sintetizada pelas células de Schwann, enquanto no SNC ela é sintetizada pelos oligodendrócitos. A composição da mielina é predominantemente lipídica, os lipídios constituem cerca de 70% da sua estrutura tanto no SNC como no SNP. A fração protéica corresponde a 30% consistindo basicamente de dois constituintes principais: proteína mielínica básica e proteínas proteolíticas (Van der Goes & Dijkstra, 2001). No SNC seus constituintes lipídicos incluem: Colesterol (19,4%); Galactolipídios (19,3% - 16% cerebrosídeos; 2,7% sulfatídeos; 0,2-0,4% galglicosídeos) e Fosfolipídios (30,2% - 11% fosfatidiletanolina; 7,8% fosfatidilcolina; 5,5% esfingomiélin; 0,4% monofosfatidilinositol, plasmalógenos e outros) (Norton, 1981).

O processo de mielinização envolve a aposição espiral de membranas celulares derivadas das células mielinogênicas ao redor de axônios selecionados (fig. 4), formando uma bainha isolante de mielina que, entre outros, contribui para aumentar a velocidade de propagação do impulso nervoso, atribuindo maior eficiência na transmissão da sinalização.

O processo de mielinização tem uma relação direta com a aprendizagem e o comportamento motor. As diferentes áreas do córtex não sofrem mielinização homogênea. As regiões corticais com mielinização precoce controlam movimentos relativamente simples ou análises sensoriais, enquanto as áreas com mielinização tardia controlam as funções mentais elevadas. Assim, pode-se afirmar que a mielinização funciona como um índice aproximado da maturação cerebral (Kolb & Whishaw, 2002).



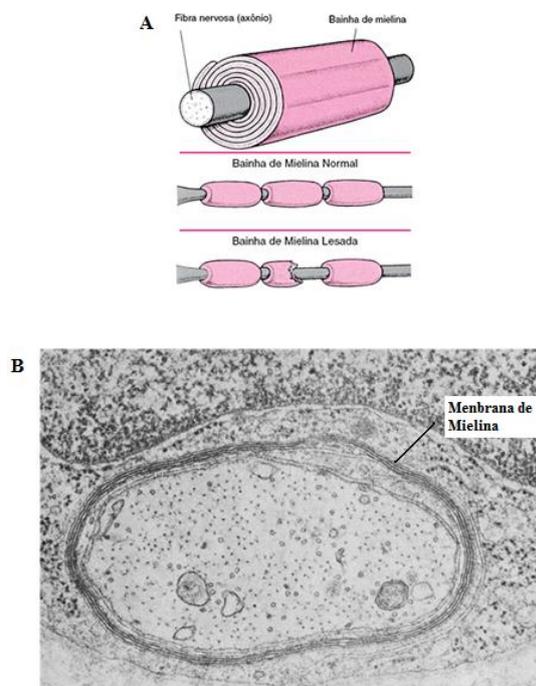
**Figura 4:** Neurônio mielinizado. (A) Figura meramente ilustrativa; (B) Microscopia eletrônica de um corte

transversal de nervo ciático de rato (Lampert e col., 1970).

#### 2.2.4. Desmielinização

Desmielinização é o nome empregado ao processo de degeneração das membranas de mielina já formadas, desta maneira, há uma redução ou total perda do envelamento mielínico do axônio (fig. 5). Existem basicamente dois tipos de desmielinização: a primária e a secundária. Denomina-se desmielinização primária quando a lesão na mielina ocorre por instabilidade ou dano na célula mielinogênica, porém com preservação dos axônios, enquanto que desmielinização secundária ocorre devido primeiramente a uma lesão neuronal levando subseqüentemente a degeneração da mielina (Siegel, 1999; Lazzarini, 2004).

A desmielinização no sistema nervoso pode ocorrer devido a uma variedade de condições patológicas, incluindo intoxicações, desordens metabólicas e nutricionais, infecções virais, trauma mecânico e inflamação (Hauw e col., 1992), prejudicando assim a transmissão do impulso nervoso, implicando no aparecimento de diversos distúrbios neurológicos.



**Figura 5:** Axônio desmielinizado. (A) Figura ilustrativa de um neurônio com a bainha de mielina normal e com a membrana de mielina lesionada; (B) Microscopia eletrônica de um corte transversal de nervo ciático de rato (Lampert e col., 1970).

### **2.2.5. Doenças Desmielinizantes**

A esclerose múltipla (EM) é a doença desmielinizante mais comum do SNC afetando aproximadamente mais de 2 milhões de pessoas em todo o mundo (Javed & Reder, 2005), sendo a incidência maior em mulheres na faixa etária de 20 a 40 anos (Reipert, 2004).

A EM é uma doença inflamatória do SNC caracterizada pela desmielinização e pela formação de placas de mielina em numerosos pontos do SNC, que se manifesta clinicamente pelo aparecimento, ao longo do tempo, de deficiências neurológicas ora progressivas, ora recidivantes e remitentes. Sua etiologia é desconhecida, mas suas lesões patológicas predominam na substância branca do SNC, constituindo-se de uma destruição imunológica das bainhas de mielina, enquanto os axônios permanecem relativamente preservados, podendo apresentar sinais de axonopatia (Weiner & Goetz, 2003). Estes danos causados no tecido nervoso resultam em um bloqueio ou atraso das sinapses nervosas, levando ao aparecimento de diversos sintomas neurológicos (Radtke e col., 2007). Atualmente, sabe-se que a maioria dos sintomas e sinais da EM deve ser atribuída ao comprometimento da medula espinhal e do tronco cerebral. Sobretudo os sinais motores e sensitivos dos membros são devidos, na maior parte, às lesões da medula (Weiner & Goetz, 2003).

Caracterizada por uma inflamação aguda com perda da mielina dos nervos periféricos, a Síndrome de Guillain-Barré (GBS) é uma designação para um grupo de neuropatias periféricas agudas imuno-mediadas, cada uma com suas características especiais, clínicas e patológicas. Atualmente, a classificação da GBS abrange diferentes formas ou subtipos, determinados de acordo com o componente afetado no sistema nervoso (Hughes & Cornblath, 2005). Entre os subtipos patológicos estão a: Polirradiculoneuropatia desmielinizante e inflamatória aguda; Neuropatia axonal motora e sensitiva aguda, que afeta fibras nervosas motoras e sensitivas; Neuropatia axonal motora aguda, quando a deficiência clínica neurológica é puramente motora; Síndrome de Miller Fisher, variante que afeta os nervos craniais. A incidência da GBS é muito menor que a EM, mas constitui um exemplo clínico de desmielinização primária podendo apresentar lesão axonal em casos mais severos (Bear e col., 2002).

A desmielinização é um evento que não está necessariamente associado a uma patologia, quando o axônio é submetido à injúria, seja ela traumática ou isquêmica, há a degeneração axonal seguida de desmielinização (secundária), à este tipo de lesão dá-se o nome de degeneração Walleriana (DW). A DW caracteriza-se pelo colapso do citoesqueleto axonal e pela fragmentação e degradação da bainha de mielina por células de Schwann e

macrófagos (Griffin & Hoffman, 1993).

### **2.2.6. Modelos de Desmielinização**

O desenvolvimento de modelos animais de desmielinização pós-natal é uma importante ferramenta para prospectivas estratégias terapêuticas. Numerosos modelos experimentais que mimetizam a fisiopatologia do processo de desmielinização têm sido desenvolvidos. Entre os xenobióticos descritos na literatura que causam desmielinização do sistema nervoso estão o telúrio (Lampert e col, 1970), o brometo de etídio (Graça e col., 2001), a cuprizona (Gudi e col., 2009), a lisolecitina (Doering & Yong, 2008), o cianeto (Hirano e col., 1967), fosfatidilcolina (Blakemore e col., 1977) e drogas hipocolesterolêmicas (Suzuki & Zaragoren, 1974).

A indução do processo desmielinizante em animais pode ocorrer também, pela inoculação de vírus ou agentes que desencadeiam uma resposta imunológica atacando as membranas de mielina, para isso são usados: Adição de soro mielinotóxico de encefalomielite alérgica experimental (Kusaka e col., 1985) ou soro específico antigalactocerebrosideo (Fry e col., 1974); Inoculação de vírus líticos que infectam os oligodendrócitos, como por exemplo, o da hepatite em camundongos (Fleury e col., 1980), entre outros. Além destes modelos, o uso da pressão mecânica sobre a mielina, de maneira focal e leve (Harrison & McDonald, 1977) ou por aumento crônico da compressão (Clifford-Jones e col, 1985) mimetiza a DW em modelos animais.

### **2.2.7. Telúrio**

O elemento telúrio foi descoberto em 1782. Entretanto, a inclusão desse átomo em moléculas orgânicas ocorreu no início do século XIX. No Brasil, a química de telúrio foi introduzida pelo Prof. Reinbolt, o qual se dedicou ao estudo sistemático de compostos orgânicos contendo telúrio e sua aplicabilidade como intermediários em síntese orgânica (Petraghani, 1995; Comasseto e col., 1997; Zeni e col., 2006).

O telúrio é um elemento que pertence ao grupo 16 da tabela periódica, podendo apresentar-se sob múltiplos estados de valência, que vão de  $-2$  a  $+6$  (apresenta-se sob quatro estados de oxidação: telurato ( $\text{Te}^{+6}$ ), telurito ( $\text{Te}^{+4}$ ), telúrio elementar ( $\text{Te}^0$ ) e telureto ( $\text{Te}^{-2}$ )) (Scansetti, 1992). Esse elemento é encontrado com maior frequência na forma de teluretos

com ouro, bismuto, chumbo e prata.

Telúrio elementar ( $\text{Te}^0$ ) é usado como componente de muitas ligas metálicas, na composição da borracha, na indústria de microchips, de componentes eletrônicos e em sistemas de energia fotovoltaica. Ele também é utilizado na produção industrial de vidro e aço, e como um aditivo anti-detonante na gasolina (Fairhill, 1969). O telúrio é encontrado em muitos minérios, juntamente com o selênio, e é fabricado como um sub-produto no refinamento do cobre, do chumbo, do bismuto e de outros metais (U.S. Bureau of Mines, 1985). Atualmente, telúrio inorgânico é encontrado em soluções oxidantes que servem para polir metais (Yarema & Curry, 2005) e na indústria de semicondutores particulados (Green e col., 2007; Zhang & Swihart, 2007).

#### **2.2.7.1. Propriedades Toxicológicas do Telúrio**

O aumento do uso industrial de produtos químicos provoca riscos ocupacionais e ambientais para a saúde humana, e cresce a preocupação em relação aos potenciais efeitos adversos desses compostos. Os primeiros relatos a respeito da toxicidade do telúrio aconteceram após o acidente de Windscale (UK) (Stewart & Crooks, 1958).

O telúrio pode ser prontamente absorvido pelo organismo, através da dieta, principalmente na forma de compostos orgânicos. Entretanto, a exposição e a absorção de telúrio inorgânico na forma de teluritos e teluratos também ocorre (Larner, 1995). Casos de intoxicação ocupacional aguda por telúrio são raros, entretanto, quando ocorrem, os sintomas são: dores de cabeça, sonolência, náuseas, alteração da frequência cardíaca, bem como odor característico de alho, na respiração e na urina (Müller e col., 1989; Taylor, 1996).

A toxicidade do Te parece estar relacionada ao seu estado de oxidação (Van Vleet e col., 1982). O mecanismo proposto para explicar essa toxicidade envolve a oxirredução de grupos  $-\text{SH}$  de moléculas biologicamente ativas (Blais e col., 1972; Young e col., 1981; Deuticke e col., 1992). De fato, os compostos de telúrio, inibem enzimas sulfidrílicas, incluindo  $\delta$ -aminolevulinato desidratase (Barbosa e col., 1998; Nogueira e col., 2003), esqualeno epoxidase (Laden and Porter, 2001) e  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase (Borges e col., 2005).

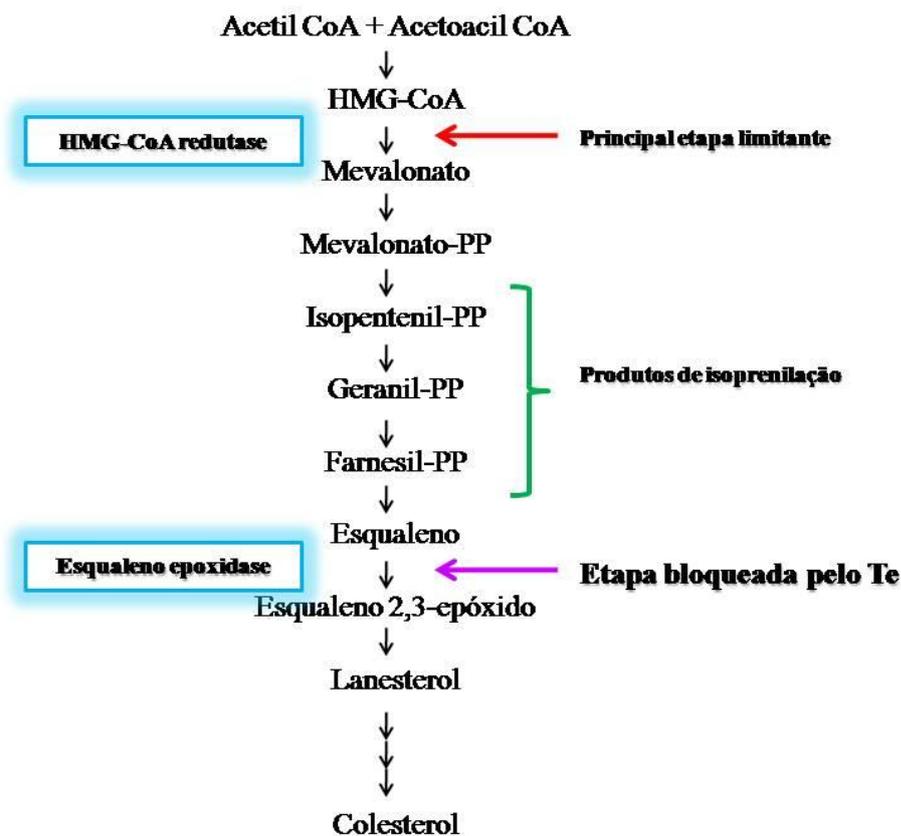
Os compostos de telúrio, que têm propriedades metálicas, atravessam a barreira cérebrosangue, barreira placentária e a barreira ependimal-fluido cérebro espinhal-sangue fetal (Duckett & Ellem, 1971). Já foi demonstrado que telúrio metálico atravessa as membranas celulares e se localiza no citoplasma das células (Blinzinger & Hager, 1965,

Mizuno, 1969), mais especificamente nas mitocôndrias, nos primeiros estágios de intoxicação (Duckett & White, 1974). E que a ingestão de determinadas quantidades de telúrio por mamíferos adultos e pássaros faz com que apareçam grânulos negros ou cristais em forma de agulha no citoplasma das células do sistema urogenital, do trato alimentar, dos órgãos respiratórios, do sistema reticulo-endotelial e do sistema nervoso (Pentschew e col., 1962, Carlton & Kelly, 1967). O metabolismo do telúrio nos tecidos não está esclarecido, mas é sugerido que os depósitos negros ou os cristais puntiformes são telúrio reduzido ou telúrio elementar (Duckett, 1972).

#### **2.2.7.2. Desmielinização Induzida pelo Telúrio**

Atribui-se ao bloqueio da síntese do colesterol, que é um precursor da mielina, a atividade neurotóxica de compostos que contêm telúrio. Os compostos de telúrio inibem a atividade da enzima esqualeno epoxidase, responsável pela conversão do esqualeno à esqualeno 2,3-epóxido, um precursor do colesterol (fig. 6). Dessa forma, o esqualeno acaba se acumulando. A sensibilidade da enzima ao telúrio se deve à reação desse elemento com grupamentos sulfidrílicos e com a ligação de cisteínas vicinais (Laden & Porter, 2001). Sendo assim, o telúrio inibe a síntese de colesterol nas células de Schwann, o que resulta no bloqueio da formação de mielina e no acúmulo de esqualeno.

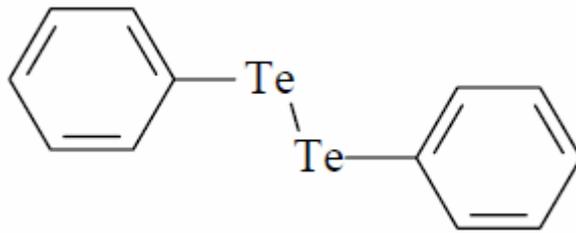
A consequência desse processo é uma desmielinização ou hipomielinização, que pode ser a causa das neuropatias ocasionadas por esses compostos (Wagner-Recio e col., 1994). Os efeitos da intoxicação com telúrio no sistema nervoso têm sido estabelecido como sugestivo de neuropatia periférica durante um período ativo de mielinogênese (Duckett e col., 1979; Harry e col., 1989; Lampert & Garrett, 1971), afetando a produção de proteínas mielínicas em nível de gene (Morell e col., 1994). A suscetibilidade preferencial do sistema nervoso periférico à toxicidade do telúrio depende, provavelmente, da grande demanda de colesterol pelos nervos periféricos, e uma menor taxa de acúmulo de colesterol no cérebro (Rawlins & Smith, 1971). Corroborando com estes dados, alterações neuromusculares têm sido identificadas em animais após a administração de telurito inorgânico (Duckett e col., 1979).



**Figura 6:** Biossíntese do colesterol. O principal passo regulador da via é catalisado pela enzima HMG-CoA redutase, o telúrio inibe seletivamente a esqualeno epoxidase (figura modificada, Towes, 1997).

### 2.2.7.3. Ditelureto de difenila

O ditelureto de difenila (fig. 7) é um composto orgânico de telúrio amplamente usado como intermediário na síntese orgânica (Zeni e col., 2006). Estudos experimentais demonstraram que o  $(\text{PhTe})_2$  possui potencial toxicológico em modelos animais (Nogueira e col., 2004). Nosso grupo de pesquisa obteve resultados que indicam que o  $(\text{PhTe})_2$  é um composto neurotóxico em ratos e camundongos (Nogueira e col., 2001; 2002; Moretto e col., 2003), além de causar toxicidade renal e hepática em roedores, quando administrado em doses muito baixas (Meotti e col., 2003).



**Figura 7:** Estrutura química da ditelureto de difenila.

A exposição ao  $(\text{PhTe})_2$  altera parâmetros comportamentais relacionados com funções neurais em ratos jovens (Stangherlin e col., 2006; 2009a). Segundo Moretto e colaboradores (2007), o  $(\text{PhTe})_2$  induz uma inibição dos canais de cálcio no cérebro de ratos, o comprometimento destes canais poderia explicar, pelo menos em parte, os efeitos neurotóxicos deste composto. Corroborando com estes achados, Stangherlin e colaboradores (2009b) reportaram que os filhotes de ratos expostos ao  $(\text{PhTe})_2$  via leite materno, apresentaram estresse oxidativo no córtex, hipocampo e estriado. Além disso, constatou-se que o  $(\text{PhTe})_2$  é teratogênico em fetos de ratos (Stangherlin e col., 2005; Roman e col., 2007), o ditelureto de difenila, quando administrado em ratas prenhas, causa múltiplas malformações nos fetos em desenvolvimento (Stangherlin e col., 2005).

### **2.2.8. Acetilcolinesterase (AChE)**

A neurotransmissão mediada pela acetilcolina (ACh) é fundamental para o correto funcionamento do SNC, e desempenha um papel fundamental em várias funções vitais, como aprendizado, memória, organização cortical do movimento, processamento de informações sensoriais e controle do fluxo sanguíneo cerebral (Mesulan e col., 2002; Gotti & Clementi, 2004). Os neurônios colinérgicos inervam a musculatura voluntária do sistema somático e também são encontrados no SNC (Soreq & Seidman, 2001).

Uma vez liberada nas sinapses, a ACh é degradada pela enzima AChE em acetato e colina, sendo esta última recaptada pelo neurônio. O sítio ativo da acetilcolinesterase é composto por uma tríade catalítica que contém resíduos de serina, de histidina e de um grupo ácido (glutamato ou aspartato). O mecanismo de hidrólise da AChE envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água recupera o sítio catalítico da enzima (Soreq & Seidman, 2001).

Além de seu papel clássico na transmissão colinérgica a AChE tem sido implicada em várias ações não colinérgicas como crescimento dos neuritos (Day & Greenfiel, 2002), regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica, osteogênese (Chacón e col., 2003) e também tem sido proposto a atividade hematopoiética pela presença desta enzima em células progenitoras do sangue (Soreq & Seidman, 2001). A AChE também foi localizada e identificada em linfócitos onde provavelmente apresenta um papel importante na regulação das funções imunes (Kawashima & Fugii, 2000). Assim uma inibição ou ativação desta enzima pode ter conseqüências devastadoras no cérebro e outros órgãos (Mesulan e col., 2002). Com isso, a ativação do sistema colinérgico foi demonstrada como sendo importante no desenvolvimento das estruturas cerebrais (Zirger e col., 2003) e interferências na neurotransmissão colinérgica durante o desenvolvimento produzem danos estruturais com efeitos no comportamento (Hohmann, e col., 1991). Segundo Mazzanti e colaboradores (2009), os eventos desmielinizantes podem interferir na atividade da AChE.

## **PARTE III**

### 3. RESULTADOS

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito intitulado “**Diphenyl ditelluride induces impairment of developmental behavioral, neurotoxicity and demyelination in central nervous system of rat pups**”, o qual se encontra subdivido em introdução, resultados, discussão, materiais e métodos e referências, seguido das legendas e figuras. O manuscrito está disposto da mesma forma que foi submetido para avaliação na *Brain Research*.

**Diphenyl ditelluride induces impairment of developmental behavioral,  
neurotoxicity and demyelination in central nervous system of rat pups**

Simone Pinton<sup>1</sup>, Cristiane Luchese<sup>1</sup>, Eluza Curte Stangherlin<sup>1</sup>, Silvane Souza Roman<sup>1,2</sup> and

Cristina Wayne Nogueira<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, CEP 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim, CEP 99700-000, Erechim, RS, Brazil

Number of text pages: 31

\*Correspondence should be sent to:

Cristina Wayne Nogueira

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

Phone: 55-55-3220-8140

FAX: 55-55-3220-8978

E-mail: [criswn@quimica.ufsm.br](mailto:criswn@quimica.ufsm.br)

## **Abstract**

The purpose of this study was to investigate if myelinogenesis is related to the mechanism by which diphenyl ditelluride [(PhTe)<sub>2</sub>] causes toxicity in rat pups. The present study was performed to examine whether the behavioral performance is related to demyelination process induced by (PhTe)<sub>2</sub> in rat pups. Acetylcholinesterase (AChE) activity was carried out in cerebral cortex of rat pups since studies have demonstrated that demyelinating events interfere with the activity of this enzyme. Rat pups received a single subcutaneous injection of (PhTe)<sub>2</sub> or vehicle (canola oil) at 14<sup>th</sup> post natal day (PND). From day 1 to 7 (PND 15 to 21) after exposure, negative geotaxis, forelimb support and open field tests were performed in pups. Rat pups were euthanized daily (from day 1 to 7) immediately after the behavioral tests. The cerebral density of myelin and histological analysis were performed. The appearance of classic signs of toxicity, behavioral alterations and demyelination of CNS was dependent of the time after (PhTe)<sub>2</sub> exposure to rat pups. Neuronal damage, revealed by histological analysis, and the increase in AChE activity occurred at 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> day after (PhTe)<sub>2</sub> exposure, which is coincident with the critical period of demyelination. In conclusion, exposure to (PhTe)<sub>2</sub> induced an impairment of developmental behavioral, neurotoxicity and demyelination in the central nervous system of rat pups.

**Section:** Nervous System Development, Regeneration and Aging.

**Key-words:** Tellurium, Developmental Behavioral, Demyelination, Neurotoxicity, Acetylcholinesterase.

## 1. Introduction

Diphenyl ditelluride [(PhTe)<sub>2</sub>] is an organotellurium compound widely used as intermediate in organic synthesis (Zeni et al., 2006). Besides its use as an organic reactant, (PhTe)<sub>2</sub> has been reported as a neurotoxic compound in rodents (Nogueira et al., 2001; 2002; Moretto et al., 2003). (PhTe)<sub>2</sub> is teratogenic to rat fetuses (Stangherlin et al., 2005), changes behavioral parameters related to neural function (Stangherlin et al., 2006) and causes oxidative stress in cerebral areas in young rats (Stangherlin et al., 2009). The impaired function of calcium channels may explain the deleterious action of (PhTe)<sub>2</sub> in the brain, a fact that might explain at least in part its neurotoxic effects (Moretto et al., 2007). Although the specific molecular targets that mediate organochalcogen toxicity are not known, these compounds can interact directly with low molecular thiols, oxidizing them to disulfides (Nogueira et al., 2004).

Some authors reported that rats exposed to tellurium develop a demyelination process following remyelination process (Lampert et al., 1970; Harry et al., 1989). The effects of tellurium intoxication on the nervous system have been established as suggestive of peripheral neuropathy during a period of active myelinogenesis (Duckett et al., 1979; Harry et al., 1989) affecting transcription of the myelin proteins at the gene level (Morell et al., 1994; Toews et al., 1997a) and inhibiting the cholesterol synthesis (Lampert and Garrett, 1971).

Demyelination in the central nervous system (CNS) occurs due to a variety of pathophysiological conditions. Perhaps the most notable is demyelination associated with multiple sclerosis (MS). MS is thought to be an autoimmune disease characterized by inflammatory lesions throughout the brain and the spinal cord. MS lesion sites can present with both distinct demyelination and with axonopathy (Trapp et al., 1999). Inside of this context, numerous experimental models that mimic the pathophysiology of the process of demyelination have been developed, using chemical inductors, such as elemental tellurium

(Jackson et al., 1989), ethidium bromide (Graça et al., 2001), cuprizone (Gudi et al., 2009) and lysolecithin (Doering and Yong, 2008).

Therefore, the purpose of this study was to investigate if myelinogenesis is related to the mechanism by which  $(\text{PhTe})_2$  causes toxicity in rat pups. The present study was performed to examine whether the behavioral performance is related to demyelination process induced by  $(\text{PhTe})_2$  in rat pups. Moreover, acetylcholinesterase (AChE) activity was carried out in cerebral cortex of rat pups since studies have demonstrated that demyelinating events interfere with the activity of this enzyme, which plays a crucial role in the CNS (Mazzanti et al., 2009).

## **2. Results**

### **2.1. Signs of tellurium toxicity**

After exposure to  $(\text{PhTe})_2$  rat pups presented the following signs of toxicity: garlic-like odor and diarrhea (start at 1<sup>st</sup> day and persist through the end of the experiment), partial or complete paralysis of hind legs and tremors (start at 3<sup>rd</sup> day and persist through 5<sup>th</sup> day), body hair loss (5<sup>th</sup> day) and gradual recovery of paralysis (6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day). The animals exposed to  $(\text{PhTe})_2$  demonstrated a significant reduction in the body weight from 3<sup>rd</sup> day to the end of the experiment (Figure 2).

### **2.2. Behavioral Tests**

#### **2.2.1. Negative geotaxis**

At 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> day after exposure to  $(\text{PhTe})_2$ , rat pups presented a significant increase in the latency to correct body position when compared to the respective control groups. From 5<sup>th</sup> day to the end of the experiment, the latency for animals to correct body position returned to control levels. Negative geotaxis was not altered in rat pups from all other groups (Figure 3).

### **2.2.2. Forelimb support**

Forelimb support latency of rat pups was similar in (PhTe)<sub>2</sub> and the respective control groups up to 5<sup>th</sup> day after exposure. From 6<sup>th</sup> day to the end of the experiment, the latency of forelimb support was higher in the respective control groups than in (PhTe)<sub>2</sub> groups (Figure 4).

### **2.2.3. Open field**

At 7<sup>th</sup> day after (PhTe)<sub>2</sub> exposure, rat pups presented a significant decrease in locomotor (crossing: control =  $31.2 \pm 4.1$  and (PhTe)<sub>2</sub> =  $15.1 \pm 2.8$ ) and exploratory (rearing: control =  $17.9 \pm 2.1$  and (PhTe)<sub>2</sub> =  $6.7 \pm 3.1$ ) activities when compared to the respective control group.

### **2.3. AChE activity**

AChE activity was increased in cerebral cortex of rat pups at 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> day after exposure to (PhTe)<sub>2</sub> when compared to the respective control groups. There was no alteration in AChE activity in cerebral cortex of rat pups from all other groups (Figure 5).

### **3.4. Myelin isolation**

Exposure to (PhTe)<sub>2</sub> caused a significant reduction in cerebral myelin density of rat pups from 4<sup>th</sup> day after exposure to the end of the experiment. At 5<sup>th</sup> day after exposure to (PhTe)<sub>2</sub>, rat pups presented the lowest cerebral myelin density (Figure 6).

### **2.5. Histological analysis**

In the cerebellar cortex of animals at 3<sup>th</sup> day after exposure to (PhTe)<sub>2</sub>, the Purkinje cell monolayer, located between the molecular and granular layers, demonstrated moderated

chromatolysis, a sign of histological alteration (compare fig. 7 A and B).

Spinal cord and cerebellar white matter in the animals exposed to  $(\text{PhTe})_2$  at 4<sup>th</sup> but mainly at 5<sup>th</sup> day after exposure presented the widened endoneural space between individual axons and inflammatory cells in some areas of parenchyma (compare fig. 7 C and D; fig. 8 C and D). In the brain areas and in the nigra matter of spinal cords,  $(\text{PhTe})_2$ -exposed rat pups demonstrated morphological changes of neurons such as eosinophilic cells, chromatolysis, loss of multipolar appearance and Nissl substance migration towards the cell periphery (compare fig. 7 E and F). The neurons clearly showed nucleus and nucleoli with retraction, hyperchromasia and pycnosis. Some of these morphological changes, although with less intensity, were observed at 3<sup>rd</sup> day after exposure to  $(\text{PhTe})_2$ .

At 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day after exposure to  $(\text{PhTe})_2$ , the disorder in the CNS induced by this compound was smaller than that of presented at 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> day, demonstrated by the appearance of filled spaces between axons, with linear axons of uniform thickness and cellular organization with a central nucleus (compare fig. 8 E and F). Additionally, neurons in the nigra matter of spinal cords presented appearance similar to the control such as normal nucleus and nucleoli, homogenous staining pattern of the Nissl substance and decreased hyperchromasia (compare fig. 7 G and H).

### **3. Discussion**

The present study shows that exposure to  $(\text{PhTe})_2$  caused immediate systemic toxicity in rat pups, demonstrated by the garlic-like odor, the classic sign of tellurium intoxication in rats (Jackson et al., 1989). Rat pups exposed to  $(\text{PhTe})_2$  presented other progressive signs of toxicity, among them hind legs paralysis which could be tentatively related to the demyelination process.  $(\text{PhTe})_2$  caused neurobehavioral effects in rat pups verified by consistent deficit in the reflects vestibular function, in the motor development and in the

muscular strength. The appearance of signs of toxicity, behavioral alterations and demyelination of the CNS were dependent on the time after (PhTe)<sub>2</sub> exposure to rat pups. The critical period after (PhTe)<sub>2</sub> exposure was at 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> day, in which histological analysis revealed various disorders in cerebral, cerebellar and spinal tissues. Besides, the increase in AChE activity was related to the period of critical demyelination.

Myelination has been regarded as one of the most useful morphological parameters for observing the development and maturation of the CNS. Abnormal myelin deposition could potentially be the result of an insult to one or more of several different stages of development. In the rat brain, most oligodendrocytes complete a proliferation phase between approximately 1-2 weeks after birth which is followed by a period of a very rapid rate of myelination (16-30 days after birth). The rate of myelination increases to a maximum at about 20 days of age and then declines to a low level that appears to be maintained throughout the life of the rats.

In the myelination period, in the developing rat model, the biochemical mechanism of hypomyelination features a specific reduction in myelin membrane synthesis rather than an increased turnover (Wiggins and Konat, 1994). The myelin deficit induced by (PhTe)<sub>2</sub> exposure during the very rapid rate of myelination period was demonstrated in this study by the reduction in myelin density and histological analysis. These results could be explained by the fact that tellurium blocks cholesterol synthesis (Laden and Porter, 2001) and causes down-regulation of myelin gene expression (Toews et al., 1997b; Barbaria et al., 2009). The unusual sensitivity of the enzyme to tellurium is due to reaction with sulfhydryls and the binding to the vicinal cysteines on squalene monooxygenase (Laden and Porter, 2001).

Rat pups exposed to (PhTe)<sub>2</sub> presented partial or complete paralysis of hind legs from 3<sup>rd</sup> to 5<sup>th</sup> day after exposure, a period coincident with demyelination, although it was most evident in rat pups at 5<sup>th</sup> day after exposure. The demyelination of the CNS was demonstrated using the sucrose gradient which showed a significant decrease in the density of myelin.

Therefore, it is plausible to assume that paralysis of hind legs is associated with demyelination process observed in rat pups exposed to (PhTe)<sub>2</sub>.

In the present report, the histological analysis revealed that rat pups exposed to (PhTe)<sub>2</sub> showed neuronal damage. Schwab and Bartholdi (1996) have demonstrated morphological changes related to chromatolysis, a reaction to axon injury, present in most neurons of the pons nuclei. Several authors have reported that these changes are caused by the alteration of the cytoplasm and of the nuclear pH and to the presence of a metabolic stage before necrosis (Yamaoka et al., 1993; Rosenblum, 1997; McD Anderson and Opeskin, 1998).

Although HE staining is not the most appropriate to confirm the demyelination of axons, the appearance of widened endoneural space between individual axons, demonstrated by the histological analysis of cerebellar white matter and brain, corroborated with the reduction of the myelin density in the groups exposed to (PhTe)<sub>2</sub>, which could be interpreted as an indication of demyelination process. Accordingly, elemental tellurium has been reported as a model of primary demyelination with little axonal degeneration (Said et al., 1981; Pun et al., 2005). Another interpretation for these findings would be that (PhTe)<sub>2</sub> is a systemic toxin that has secondary transient effect on the CNS myelination and oligodendrocytes. In fact, HNE sections suggest both neurotoxicity as well as some potential demyelination.

AChE plays a major role in the regulation of several physiological events (Milatovic and Dettbarn, 1996; Schetinger et al., 2000). Alterations in the activity of AChE have been evidenced in several neurological disorders. Therefore, inhibitors of AChE (AChEIs) have been used in the therapies of diseases such as Alzheimer and multiple sclerosis (Parry et al., 2003; Christodoulou et al., 2006). It has recently been reported that AChEIs demonstrated anti-inflammatory properties by reducing lymphocyte proliferation and the secretion of pro-inflammatory cytokines (Nizri et al., 2006) and improving myelin integrity by cholinergic

stimulation from oligodendrocytes (Bartzokis, 2007). In the present study, the activity of AChE was increased at 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> day after (PhTe)<sub>2</sub> exposure, which could suggest that myelin integrity by cholinergic stimulation from oligodendrocytes was hampered by (PhTe)<sub>2</sub> exposure.

AChE is the enzyme that degrades ACh into choline and acetic acid. The activity of this system is vital to normal behavior and muscular function (Payne et al., 1996). This is the first study aiming to investigate the in vivo effect of an organotellurium, (PhTe)<sub>2</sub>, on AChE activity in association with a demyelinating event. In this study, we demonstrated that the activity of AChE was related to the period of critical demyelination. However, the results obtained on negative geotaxis, which demonstrated a commitment of the motor and sensorial functions, are not related to cerebral AChE activity. This assertion is based on the fact that at 4<sup>th</sup> day after (PhTe)<sub>2</sub> exposure geotaxis behavior and AChE activity were found altered but at 5<sup>th</sup> day geotaxis was similar to control group and AChE activity remained increased.

The neurobehavioral response depends on developmental stage of the offspring and of developmental stage of their CNS. Besides, the muscular maturation is also very important. Accordingly, the absence of increasing in forelimb support latency in rat pups at 6<sup>th</sup> and 7<sup>th</sup> day after (PhTe)<sub>2</sub> exposure supports the idea that development of the pups muscular maturation was delayed when they were subjected to exposure to (PhTe)<sub>2</sub>. It is important to point out that no difference was found in the latency in the forelimb support between control and exposed groups until 5<sup>th</sup> day after exposure to (PhTe)<sub>2</sub>, indicating that rat pups from PND 15 to 19 are still in developmental stage of muscular strength. At 7<sup>th</sup> day after exposure to (PhTe)<sub>2</sub>, the density of myelin in brain of rat pups is still lower than that of control group at the same period, which would be consistent with the behavioral performance of rat pups in the open field test. In fact, rat pups at 7<sup>th</sup> day after exposure to (PhTe)<sub>2</sub> presented a significant decrease in locomotor and exploratory activities in the open field apparatus when compared to

the respective control groups.

In conclusion, rat pups exposed to (PhTe)<sub>2</sub> presented signs of tellurium toxicity including sensory-motor behavioral alterations. (PhTe)<sub>2</sub> caused demyelination in the CNS of rat pups exposed to this compound, hampering the normal development of the rat pups. Histological analysis confirmed that (PhTe)<sub>2</sub> induced neurotoxicity in rat pups. The increase in AChE activity was related to the critical period of demyelination.

## **4. Experimental procedure**

### **4.1. Materials**

(PhTe)<sub>2</sub> was synthesized in our laboratory according to the method described in the literature (Petraghani, 1994). Analysis of the <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectrum showed that (PhTe)<sub>2</sub> obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of compound (99.9%) was determined by GC/HPLC. This drug was dissolved in canola oil, which was obtained from a standard commercial supplier. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

### **4.2. Animals**

Virgin female Wistar rats (180 - 240 g) from our own breeding colony were used. The animals were kept on a 12 h light/dark cycle, at a room temperature of 22 ± 2°C, with free access to food and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria, Brazil. Sexually naive female rats were mated with male previously tested as fertile (three females and one male in each cage). The onset of pregnancy was confirmed by the presence of sperm in vaginal smears (day 0 of pregnancy) and pregnant dams were

immediately housed in individual cages.

The day of delivery was counted as postnatal day (PND) 0. At birth, all litters were culled to eight pups (four males and four females if possible) to ensure good nutrition. The rat pups were kept with their mothers during the period of the experiment.

### **4.3. Experimental procedure**

As shown in Figure 1, each litter was divided into two groups: control (canola oil, 3 ml/kg) and tellurium groups (0.25  $\mu\text{mol/kg}$   $(\text{PhTe})_2$ , 3 ml/kg). The rat pups received a single subcutaneous injection of  $(\text{PhTe})_2$  or vehicle (canola oil) at 14<sup>th</sup> PND. In the following days, from day 1 to 7 (Figure 1, PND 15 to 21) after exposure, behavioral tests were performed in rat pups. Rat pups were euthanized daily (from day 1 to 7) immediately after the behavioral tests. Brains were quickly removed for enzymatic assay and myelin isolation. The brain and spinal cord were used to histological analysis.

### **4.4. Signs of tellurium toxicity**

Signs of tellurium toxicity were observed in rat pups from the 1<sup>st</sup> day (PND 15) after exposure to 0.25  $\mu\text{mol/kg}$   $(\text{PhTe})_2$  to the end of the experimental period. The signs of toxicity such as garlic-like odor, partial or complete paralysis of hind legs, diarrhea, tremors, body hair loss and reduction of the body weight were recorded.

### **4.5. Behavioral Tests**

#### **4.5.1. Negative geotaxis**

Rat pups were placed in the middle of a sandpaper covered 30° inclined surface plane, in a head down position and the latency to turn 180° to a head-up position was recorded. Negative geotaxis reflects vestibular function, motor development and activity (Crozier and

Pincus, 1926).

#### **4.5.2. Forelimb support**

Rat pup forepaws were placed on a horizontally suspended wire (1 mm in diameter), 47 cm above a soft foam rubber landing area. Each pup was timed from the moment it was placed on the wire until it was unable to remain on the wire (Fox, 1965). This test reflects muscular strength in neonate rats.

#### **4.5.3. Open field**

Open-field was made of polywood and surrounded by walls 30 cm in height. The floor of the open-field, 45 cm in length and 45 cm in width, was divided by masking tape markers into 09 squares (3 rows of 3). Each animal was placed individually at the center of the apparatus and observed for 4 min to record the locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory activities (expressed by the number of time rearing on the hind limbs) (Walsh and Cummins 1976). The open field test was only carried out in rat pups belonging to the 7<sup>th</sup> day after exposure to (PhTe)<sub>2</sub> group.

#### **4.6. Acetylcholinesterase (AChE) activity**

For AChE activity assay, samples of cerebral cortex were homogenized in 0.25M sucrose buffer (1/10, w/v) and centrifuged at 2,400×g at 4°C for 15 min. Activity of AChE was carried out according to the method of Ellman et al. (1961), using acetylthiocholine as substrate. The activity of AChE was spectrophotometrically measured at 412 nm. The activity of AChE was expressed as nmol/min/mg protein.

#### **4.7. Protein determination**

Protein concentration was measured according to the method of Lowry et al. (1951).

#### **4.8. Myelin isolation**

The myelin isolation was conducted using the method of Norton and Poduslo (1973). Brains were homogenized in approximately 20 vol. (w/v) of 0.32 M sucrose. The myelin was isolated using discontinuous sucrose gradient of 0.32 to 0.85M. After isolation, myelin was dry until the weight of the sample was stabilized. Myelin density was expressed as mg myelin/g brain.

#### **4.9. Histological analysis**

Samples of brain, cerebellum and spinal cord of each group from four different litters were randomly selected for histological study. The brain, cerebellum and spinal cords were placed in a fixative solution of 10% buffered formalin, processed by routine histological techniques, and embedded in paraffin. The histological evaluation was made on 4 µm tissue sections of brain, cerebellum and spinal cord and was stained by the haematoxylin–eosin (HE) to further analysis in a light microscope. The analyzed areas of the cerebellum and spinal cord were nigra and white matter.

### **5. References**

Barbaria, E.M., Kohl, B., Buhren, B.A., Hasenpusch-Theil, K., Kruse, F., Küry, P., Martini, R., Müller, H.W., 2009. The  $\alpha$ -chemokine CXCL14 is up-regulated in the sciatic nerve of a mouse model of Charcot–Marie–Tooth disease type 1A and alters myelin gene expression in cultured Schwann cells. *Neurobiol Dis.* 33,448-458.

Bartzokis, G., 2007. Acetylcholinesterase inhibitors may improve myelin integrity. *Biol. Psychiatry* 62, 294–301.

Crozier, W.J., Pincus, G. 1926. The geotropic conduct of young rats. *J Gen Physiol* 10, 257-269.

Christodoulou, C., Melville, P., Scherl, W.F., Mc Allister, W.S., Elkins, L.E., Krupp, L.B., 2006. Effects of donepezil on memory and cognition in multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 245, 127-136.

Doering, A., Yong, V.W., 2008. Characterization of lysolecithin-induced demyelination, with a focus on the early inflammatory responses and their possible roles. *J Neuroimmunol* 203, 247-247.

Duckett, S., Said, G., Streletz, L.G., White, R.G., Galle, P., 1979. Tellurium-induced neuropathy. Correlative physiological, morphological and electron microprobe studies. *Neuropathol and Appl Neurobiol* 5, 265-278.

Ellman, G.L., Courtney, D.K., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7, 88-95.

Fox, W.M., 1965. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav* 13, 234-241.

Graça, D.L., Bondan, E.F., Pereira, L.A.V.D., Fernandes, C.G., Maiorka, C.P., 2001.

Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. *Arq Neuropsiquiat* 59, 358-361.

Gudi, V., Moharregg-Khiabani, D., Skripuletz, T., Koutsoudaki, P.N., Kotsiari, A., Skuljec, J., Trebst, C., Stangel, M., 2009. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced Demyelination. *Brain Res* doi:10.1016/j.brainres.2009.06.005.

Harry, G.J., Goodrum, J.F., Bouldin, T.W., Wagner-Recio, M., Toews, A.D., Morell, P. 1989. Tellurium-induced neuropathy: metabolic alterations associated with demyelination and remyelination in rat sciatic nerve. *J Neurochem* 52, 938-945.

Jackson, K.F., Hammang, J.P., Worth, S.F., Duncan, I.D. 1989. Hypomyelination in the neonatal rat central and peripheral nervous systems following tellurium intoxication. *Acta Neuropathol* 78, 301-309.

Laden, B., Porter, T., 2001. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds. Evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *J Lipid Res* 42, 235-240.

Lampert, P., Garbo, F., Pentschew, A., 1970. Tellurium Neuropathy. *Acta Neuropathol* 15, 308-317.

Lampert, P., Garrett, R.S., 1971. Mechanism of demyelination in tellurium neuropathy: Electron microscopic observations. *Lab Invest* 25, 380-388.

Lowry, O.H., Rosemburg, N.J., Farr, A.L., Roudall, R., 1951. Protein measurement with

Folin–Phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

Mazzanti, C.M., Spanevello, R., Ahmed, M., Schmatz, R., Mazzanti, A., Salbego, F.Z., Graça, D.L., Sallis, E.S.V., Morsch, V.M., Schetinger, M.R.C., 2007. Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Int J Devl Neuroscience* 25, 259-264.

McD Anderson, R., Opekin, K., 1998. Timing of early changes in brain trauma. *Am J Forensic Med Pathol* 19, 1-9.

Milatovic, D., Dettbarn, W.D., 1996. Modification of acetylcholinesterase during adaptation to chronic, subacute paraoxon application in rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 136, 20-28.

Morell, P., Toews, A.D., Wagner, M., Goodrum, J.F., 1994. Gene expression during tellurium-induced primary demyelination. *Neurotoxicology* 15, 171-180.

Moretto, M.B., Rossato, J.I., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003. Ebselen and diorganochalcogenides inhibition of  $45\text{Ca}^{2+}$  influx into brain synaptosomes is voltage-dependent. *J Biochem Mol Toxicol* 17, 154-160.

Moretto, M.B., Thomazi, A.P., Godinho, G., Roessler, T.M., Nogueira, C.W., Wofchuk, S., Rocha, J.B.T., 2007. Ebselen and diorganylchalcogenides decrease in vitro glutamate uptake by RAT brain slides: Prevention by DTT and GSH. *Toxicol in vitro* 21, 639-645.

Nizri, E., Hamra-Amitay, Y., Sicsic, C., Lavon, I., Brenner, T., 2006. Anti-inflammatory

properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacology* 50, 540-547.

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., Rotta, L.N., Zeni, G., Souza, D.O., Rocha, J.B.T., 2002. Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. *Neurochem Res* 27, 283-288.

Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and Pharmacology. *Chem Rev* 104, 6255-6286.

Norton, W.T., Poduslo, S., 1973. Myelination in rat brain: Method of myelin isolation. *J Neurochem* 21, 749-757.

Parry, A.M.M., Scott, R.B., Palace, J., Smith, S., Matthews, P.M., 2003. Potentially adaptive functional changes in cognitive processing for patients with multiple sclerosis and their acute modulation by rivastigmine. *Brain* 126, 2750-2760.

Payne, J.F., Mathiew, A., Melving, W., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar Pollut Bull* 32, 225-231.

Petragnani, N., 1994. Preparation of the principal classes of organic tellurium compounds. In: Katritzky AR, Meth-Cohn O, Rees CW (Eds.) *Tellurium in Organic Synthesis*. Academic Press, London, pp 9-88.

Pun, T.W.C., Odrobina, E., Xu, Q., Lam, T.Y.J., Munro, C.A., Midha, R., Sranosz, G.J. 2005. Histological and magnetic resonance analysis of sciatic nerves in the tellurium model of neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 10, 38-46.

Rosenblum, W.I., 1997 Histopathologic clues to the pathways of neuronal death following ischemia/hypoxia. *J Neurotrauma* 14, 313-326.

Said, G., Duckett, S., Sauron, B., 1981. Proliferation of Schwann cells in tellurium-induced demyelination in young rats. A radioautographic and teased nerve fiber study. *Acta Neuropathol* 53, 173-179.

Schetinger, M.R.C., Porto, N.M., Moretto, M.B., Morsch, V.M., Rocha, J.B.T., Vieira, V., Moro, F., Neis, R.T., Bittencourt, S., Bonacorso, H.G., Zanatta, N., 2000. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPase activities. *Neurochem Res* 25, 949-955.

Schwab, M.E., Bartholdi, D., 1996. Degeneration and regeneration of axons lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76, 319-370.

Stangherlin, E.C., Favero, A.M., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Teratogenic vulnerability of rat fetuses to diphenyl ditelluride: prenatal assessment. *Toxicology* 20, 231-

239.

Stangherlin, E.C., Favero, A.M., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2006. Exposure of mothers to diphenyl ditelluride during the suckling period changes behavioral tendencies in their offspring. *Brain Res Bull* 69, 311-317.

Stangherlin, E.C., Ardais, A.P., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2009. Exposure to diphenyl ditelluride, via maternal milk, causes oxidative stress in cerebral cortex, hippocampus and striatum of young rats. *Arch Toxicol* 83, 485-491.

Toews, A.D., Hostettler, J., Barrett, C., Morelli, P., 1997a. Alterations in gene expression associated with primary demyelination and remyelination in the peripheral nervous system. *Neurochem Res* 22, 1271-1280.

Toews, A.D., Roe, E.B., Goodrum, J.F., Bouldin, T.W., Weaver, J., Goines, N.D., Morell, P., 1997b. Tellurium causes dose-dependent coordinate down-regulation of myelin gene expression. *Mol Brain Res* 49, 113-119.

Trapp, B.D., Ransohoff, R., Rudick, R., 1999. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol* 12, 295-302.

Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The open-field test: a critical review. *Psychological Bull* 83, 482-504.

Wiggins, R.C., Konat, G.W., 1994. Experimental models of environmental dysmyelination

and demyelination in: *Developmental Neurotoxicology*, Chapter 3, CRC Press, pp 33-41.

Yamaoka, Y., Shimohama, S., Kimura, J., Fakunaga, R., Taniguchi, T., 1993. Neuronal damage in the rat hippocampus induced by in vivo hypoxia. *Exp Toxicol Pathol* 45, 205-209.

Zeni, G., Ludtke, D.S., Panatieri, R.B., Braga, A.L., 2006. Vinylic Tellurides: From Preparation to their Applicability in Organic Synthesis. *Chem Rev* 106, 1032-1076.

## Legends:

**Figure 1:** Experimental protocol.

**Figure 2:** Effect of (PhTe)<sub>2</sub> on the body weight gain of rat pups. Data are reported as means ± S.E.M. of 5 litters per group. (\*) Denotes  $p < 0.05$  as compared to the respective control groups (one-way ANOVA/Duncan); (▲) control and (●) (PhTe)<sub>2</sub> groups.

**Figure 3:** Effect of (PhTe)<sub>2</sub> on the negative geotaxis test of rat pups. Data are reported as means ± S.E.M. of 5 litters per group. (\*) Denotes  $p < 0.05$  as compared to the respective control groups (one-way ANOVA/Duncan); (▲) control and (●) (PhTe)<sub>2</sub> groups.

**Figure 4:** Effect of (PhTe)<sub>2</sub> on forelimb support test of rat pups. Data are reported as means ± S.E.M. of 4 to 5 litters per group. (\*) Denotes  $p < 0.05$  as compared to the respective control groups (one-way ANOVA/Duncan); (▲) control and (●) (PhTe)<sub>2</sub> groups.

**Figure 5:** Effect of (PhTe)<sub>2</sub> on AChE activity in cerebral cortex of rat pups. Data are reported as means ± S.D. of 5 litters per group. (\*) Denotes  $p < 0.05$  as compared to the respective control groups (one-way ANOVA/Duncan).

**Figure 6:** Effect of (PhTe)<sub>2</sub> on myelin density of rat pups. Data are reported as means ± S.E.M. of 4 litters per group. (\*) Denotes  $p < 0.05$  as compared to the respective control groups and (#) denotes  $p < 0.05$  as compared to the all other groups (one-way ANOVA/Duncan); (▲) control and (●) (PhTe)<sub>2</sub> group.

**Figure 7:** Photomicrography of brain, cerebellum and spinal cord showed different degrees of injury with detail on the right. A) Cerebellar cortex of control pups shows normal Purkinje cells (arrow) as a monolayer between the molecular (m) and granular layer (g). B) Observe the cerebellum of (PhTe)<sub>2</sub>-treated pups with chromatolysis signs in the Purkinje cells (arrow) localized between the molecular (m) and granular layer (g). C) Spinal cords of control shows normal axons (arrow) and myelin sheath (\*) D) Note the presence of widened spaces between axons and endoneural (arrow) and myelin sheath disorganization (\*) in the spinal cords of (PhTe)<sub>2</sub> group. E) Brain of control pups with multipolar neurons (arrow) presented Nissl

substance and nucleus and nucleoli of normal appearance. F) (PhTe)<sub>2</sub>-exposed pups brain presented neurons with retraction (arrow), hyperchromasia and pycnotic nucleus (\*). G) Note in the spinal cords of control pups the presence of normal pyramidal neurons (arrow). H) Observe in the spinal cords of treated (PhTe)<sub>2</sub> pups the neuronal organization with a central nucleus and nucleoli and a homogenous staining pattern of the Nissl substance and hyperchromasia decrease (arrow). H&E. 400x.

**Figure 8:** Photomicrography of the cerebellar white matter of: A,C,E) control pups shows normal axons (arrow), myelin sheath (\*) and oligodendrocytes (arrowhead). B) Tellurium pups with slight spaces (\*) between axons (arrow) and oligodendrocytes (arrowhead). D) Note the presence of widened spaces (\*) between axons, endoneural (arrow) and oligodendrocytes (arrowhead) in the of (PhTe)<sub>2</sub> rat pups. F) Observe diminution of axonal and endoneural spaces (\*). Note the filled spaces between axons (arrow) and oligodendrocytes (arrowhead). HE. 400x.

Figure 1

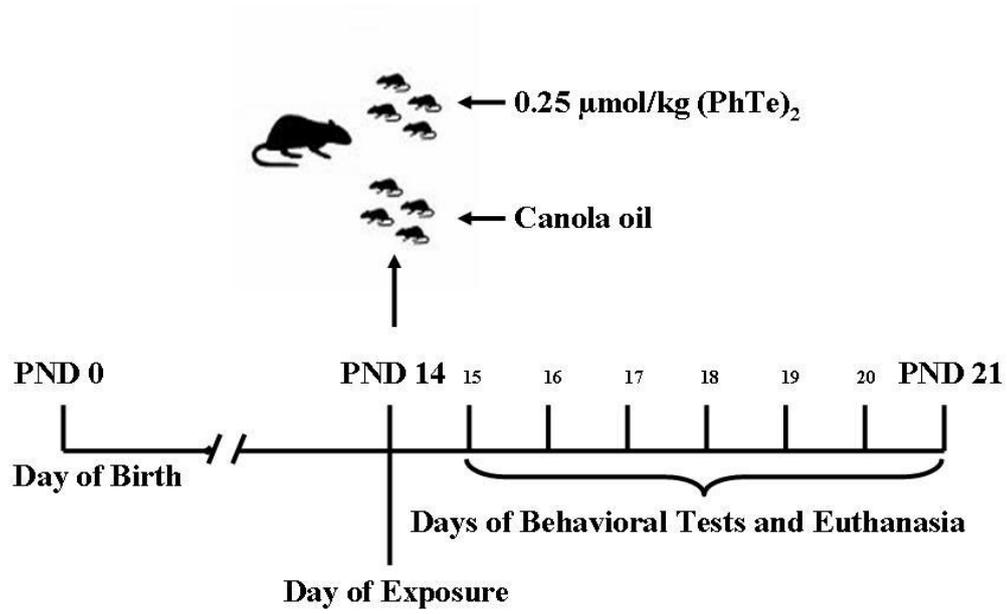


Figure 2

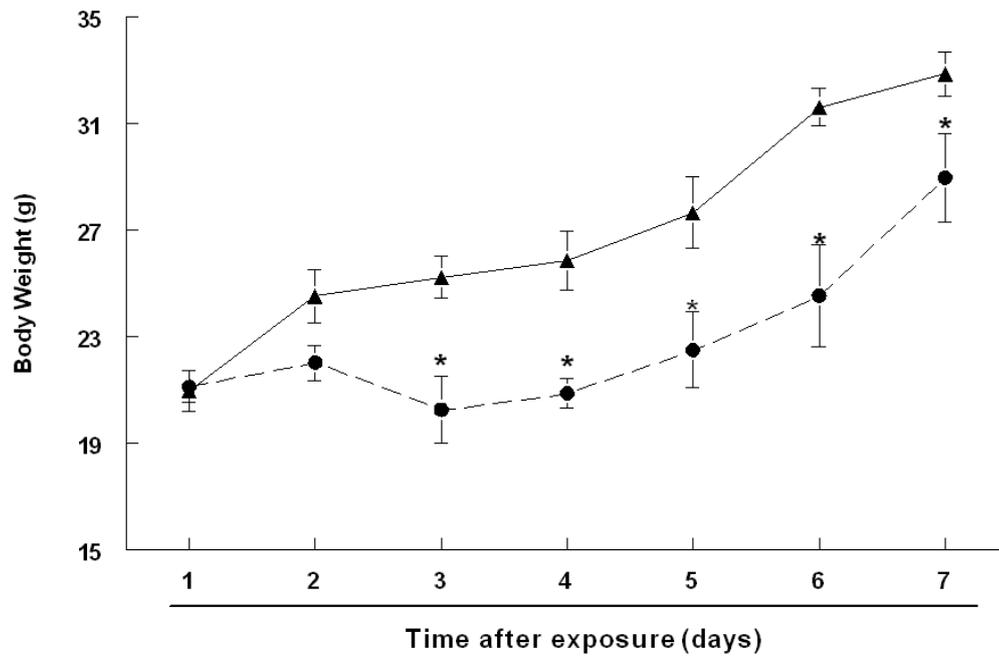


Figure 3

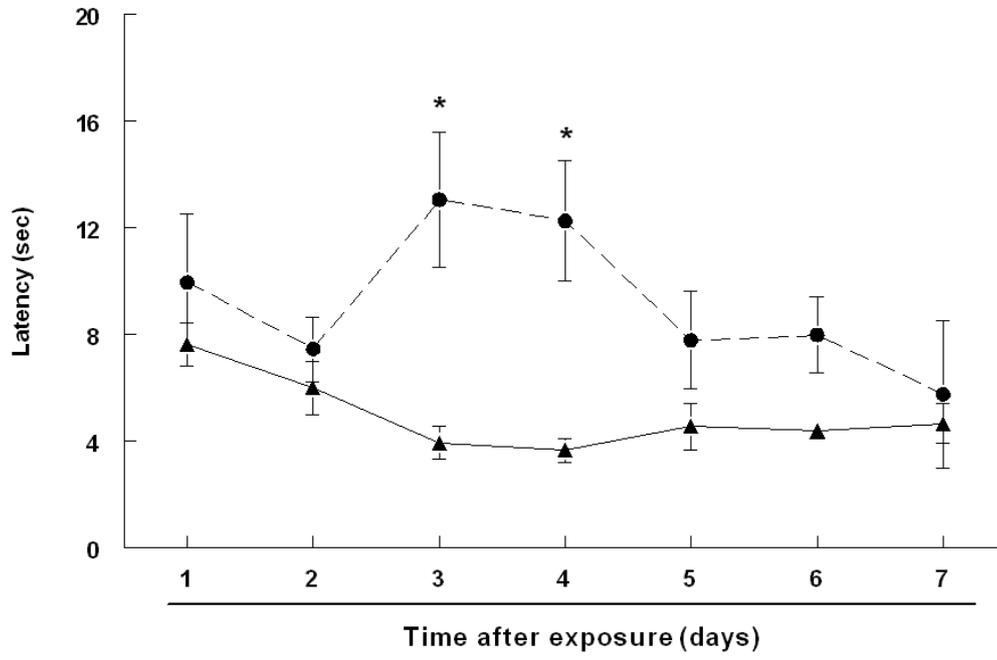


Figure 4

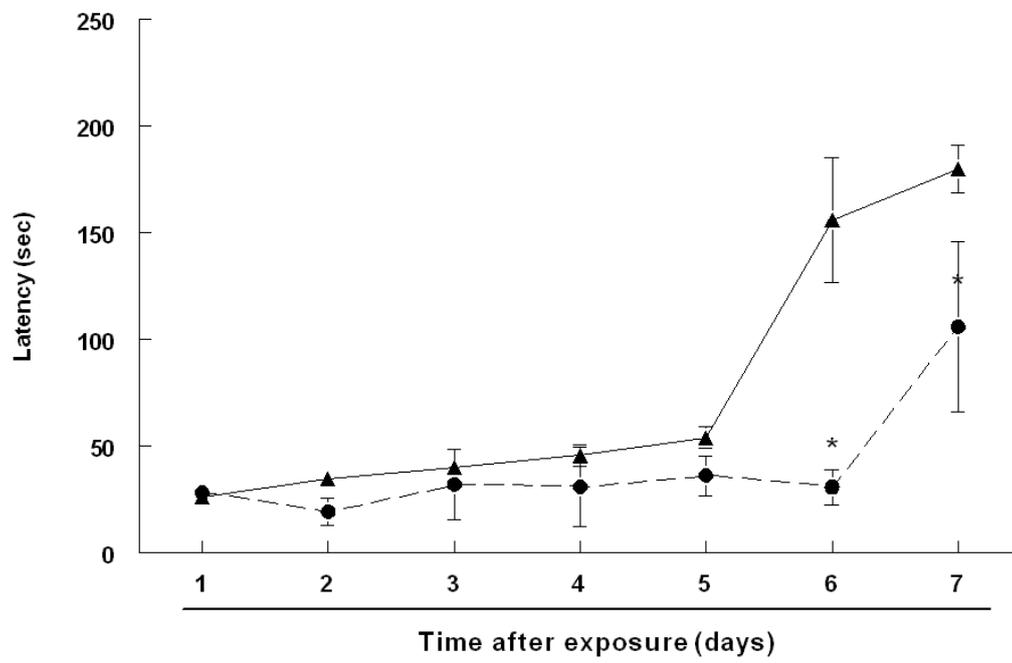


Figure 5

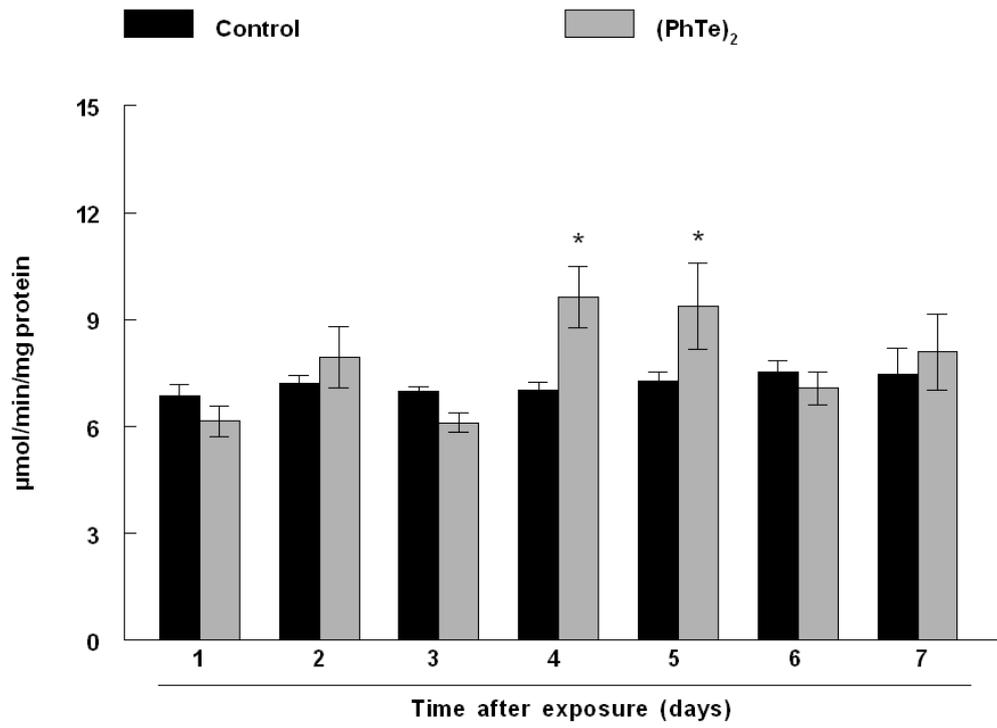


Figure 6

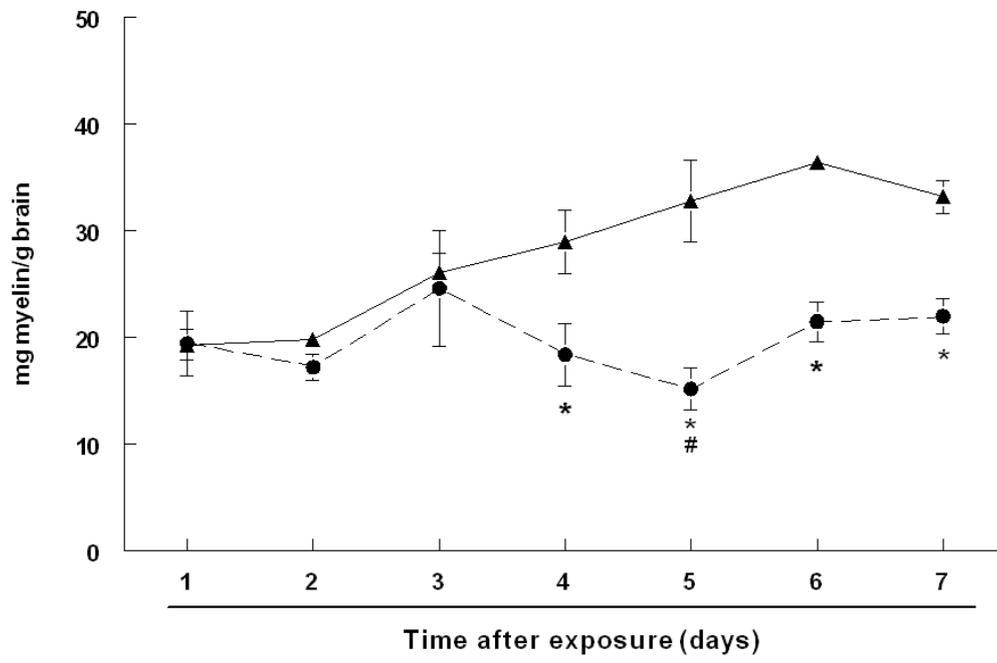


Figure 7

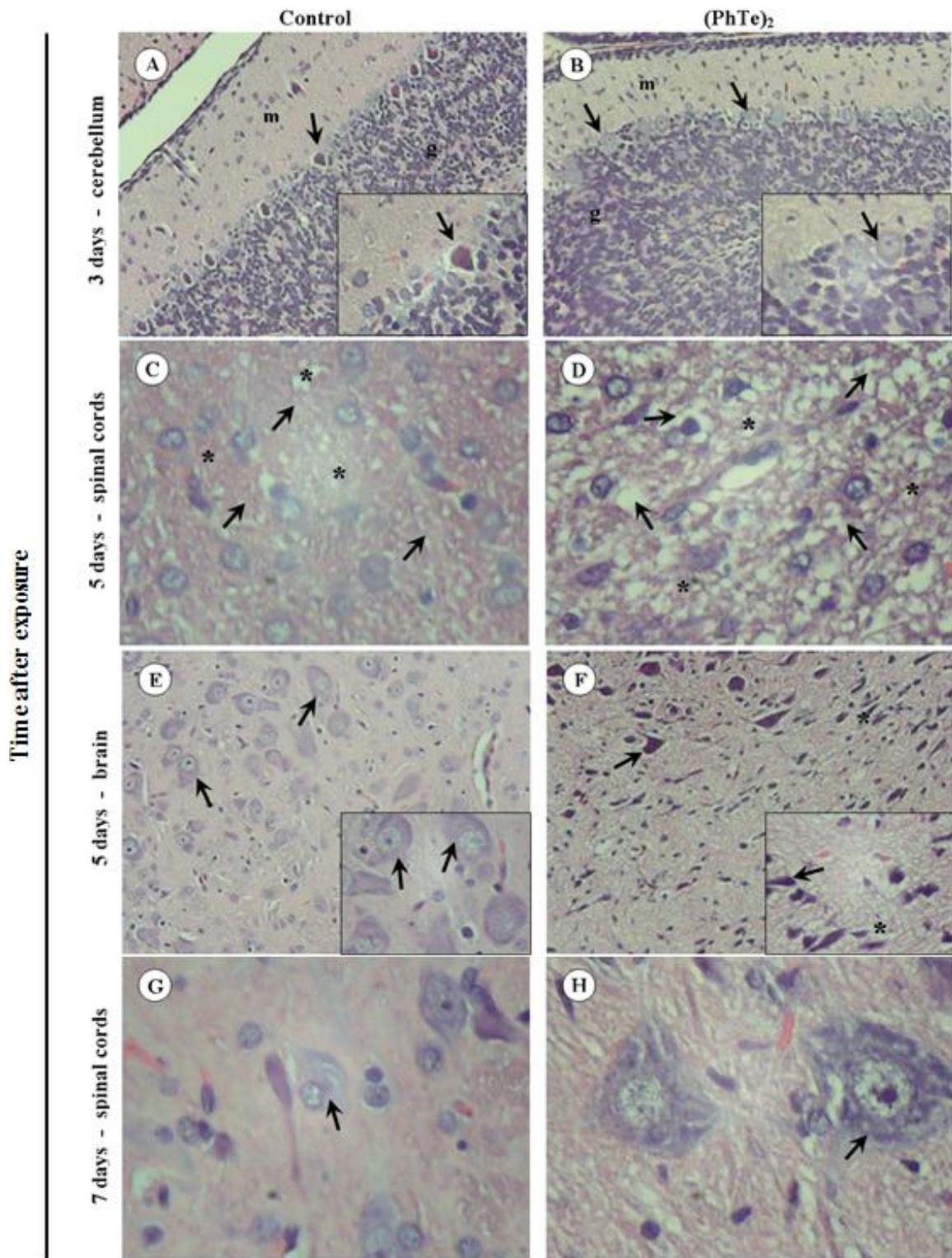
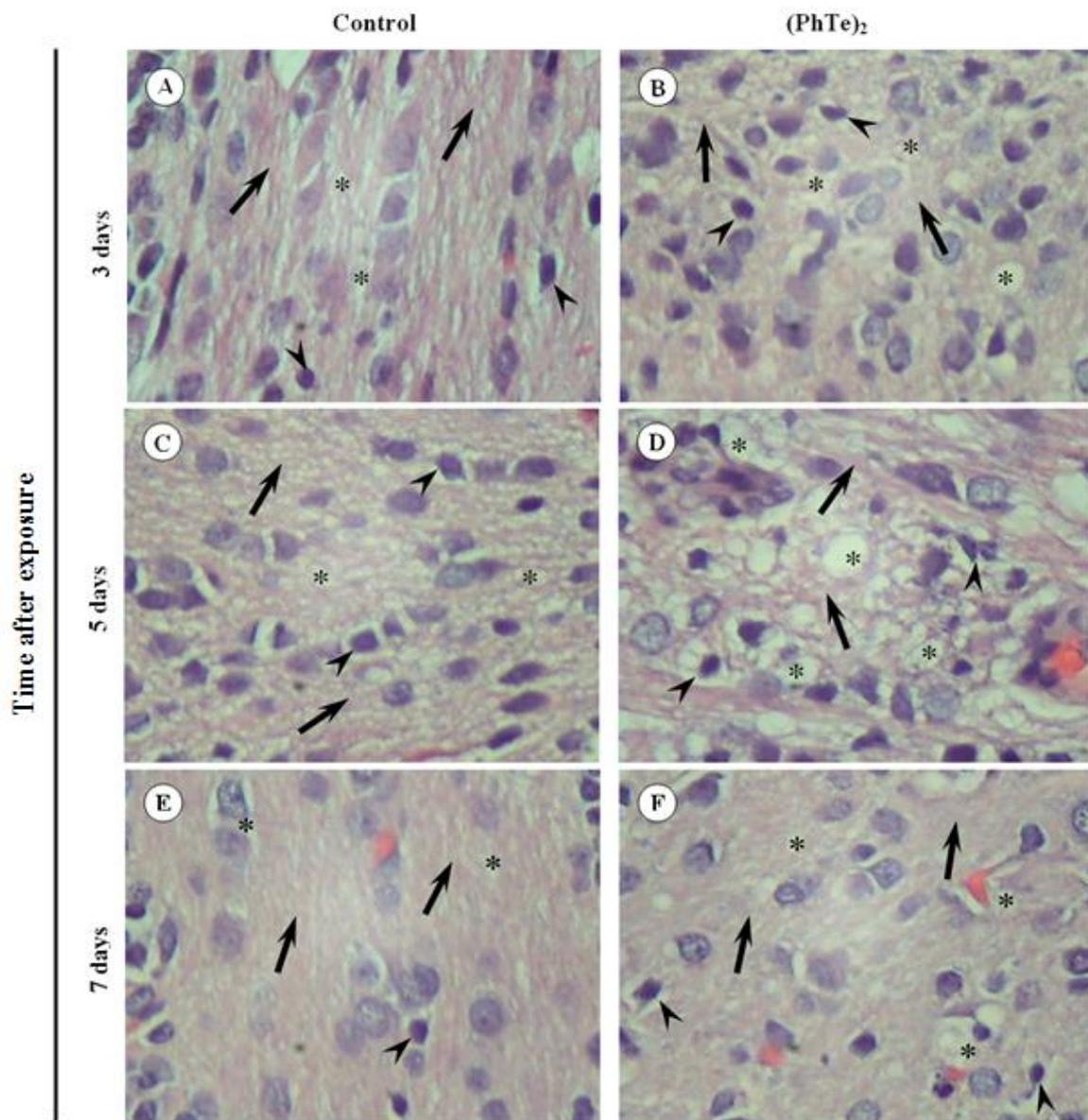


Figure 8



## **PARTE IV**

---

#### 4. DISCUSSÃO

Os resultados experimentais obtidos neste estudo, indicam que a exposição ao  $(\text{PhTe})_2$  causou uma imediata toxicidade sistêmica nos filhotes de ratos, o que pôde ser evidenciado pelo odor gárico exalado por estes filhotes após a exposição ao composto, odor este, que é um clássico sinal de intoxicação por telúrio em ratos (Jackson e col., 1989). Os filhotes de ratos expostos ao  $(\text{PhTe})_2$  apresentaram outros sinais de intoxicação, como a perda de peso, tremores, perda de pêlos, diarreia e parcial ou total paralisia dos membros pélvicos, a qual desaparecia com o tempo.

Dentre os sinais de toxicidade anteriormente descritos, destaca-se a paralisia temporária dos membros pélvicos dos ratos intoxicados com o  $(\text{PhTe})_2$ , esta perda da habilidade de controlar e/ou exercer os movimentos deve estar fortemente associada ao evento desmielinizante. Neste estudo, constatou-se que a exposição ao  $(\text{PhTe})_2$  causou uma desmielinização do SNC nos filhotes de ratos, este evento, foi claramente evidenciado usando-se um gradiente de sacarose capaz de separar as membranas de mielina do restante do tecido, após o isolamento destas membranas, elas foram desidratadas e pesadas (Brusque e col., 2001). O emprego desta técnica apontou uma redução na densidade de mielina no encéfalo dos filhotes intoxicados com o  $(\text{PhTe})_2$ .

Realmente, os filhotes de ratos que foram expostos ao  $(\text{PhTe})_2$  apresentaram uma parcial ou completa paralisia dos membros pélvicos do 3º ao 5º dia após a exposição ao composto, período este, que coincide com o período inicial da desmielinização. Uma vez que, constatou-se que o período crítico do processo de desmielinização foi no 4º e 5º dia após a exposição ao  $(\text{PhTe})_2$ . Não obstante, neste protocolo experimental, a desmielinização do SNC foi mais evidente no 5º dia após a injeção do  $(\text{PhTe})_2$ . Logo, é seguramente plausível assumir que a paralisia das patas destes filhotes está associada e/ou é decorrente do processo de desmielinização.

A desmielinização induzida pelo  $(\text{PhTe})_2$  poderia ser explicada pelo fato do Te bloquear a síntese do colesterol (Laden & Porter, 2001). O bloqueio da síntese do colesterol pelo Te deve-se a alta afinidade deste elemento por grupamentos sulfidrílicos e pelos resíduos de cisteína da esqualeno epoxidase (Laden & Porter, 2001), desta forma, ao ligar-se a enzima, o Te leva à inibição e conseqüente perda da função da mesma. A esqualeno epoxidase é uma enzima da rota de biossíntese do colesterol e é responsável pela conversão do esqualeno à esqualeno 2,3-epóxido. Uma vez que o colesterol é um dos principais lipídeos que constituem

a membrana de mielina, a inibição da esqualeno epoxidase pelo Te, induz um acúmulo de esqualeno sem que haja a formação de colesterol e conseqüentemente, resulta no bloqueio da formação de mielina.

Além da inibição da síntese do colesterol, via inibição da esqualeno epoxidase, existem dados na literatura que indicam que o Te causa uma inibição da expressão dos genes codificadores de proteínas e moléculas envolvidas na síntese e no enovelamento das membranas de mielina (Toews e col., 1997; Barbaria e col., 2009). Segundo estes dados, o Te induz uma “*downregulation*” nos genes que codificam a proteína P<sub>0</sub> de mielina, a HMG-CoA redutase e a ceramida galactosil transferase (enzima precursora da síntese de cerebrosídeos). Desta forma, pode-se concluir que o Te causa uma escassez da disponibilidade dos constituintes das membranas de mielina, o que poderia explicar o evento desmielinizante induzido por este elemento.

No cérebro do rato, a maioria dos oligodendrócitos completam a fase de proliferação entre 1 e 2 semanas após o seu nascimento o qual é seguido pelo período de mielinização. A taxa de mielinização aumenta até atingir seu máximo, em torno de 20 dias após o nascimento, quando então declina abruptamente aos níveis adultos (Davidson & Dobbing, 1966). Desta maneira, o processo de mielinização tem sido abordado como um dos mais importantes parâmetros morfológicos para a observação do desenvolvimento e da maturação do SNC. Seguindo esta mesma linha de pensamento, não é difícil admitir que os eventos desmielinizantes impliquem no aparecimento de diversos distúrbios neurológicos.

Sendo assim, as respostas neurocomportamentais dos filhotes de ratos foram avaliadas, e pôde-se observar que o (PhTe)<sub>2</sub> desencadeou efeitos prejudiciais sobre a performance comportamental destes animais. Estes efeitos nocivos foram verificados por uma consistente disfunção sensório-motora durante a execução das tarefas nos testes da geotaxia negativa, de sustentação na barra e no campo aberto.

A resposta neurocomportamental depende do estágio de desenvolvimento dos filhotes, tanto da maturação do SNC quanto muscular. Desta maneira, observou-se nos filhotes um aumento da força muscular no 20º e 21º após o nascimento, no teste de sustentação na barra. Os filhotes que receberam a injeção de (PhTe)<sub>2</sub> aos 14 dias de idade não apresentaram este comportamento. A ausência de desenvolvimento de força muscular nos remete à idéia de um atraso na maturação muscular induzido pelo (PhTe)<sub>2</sub>. Além disso, neste protocolo experimental, constatou-se que o (PhTe)<sub>2</sub> induziu um prejuízo sensório-motor nos animais no 3ª e 4º dias após a sua exposição, demonstrado claramente no teste da geotaxia negativa.

Mesmo sete dias após a exposição dos filhotes ao (PhTe)<sub>2</sub>, a densidade de mielina no encéfalo destes filhotes, ainda era inferior ao do grupo controle, o que seria coerente com o desempenho comportamental destes animais no teste do campo aberto. De fato, os filhotes de ratos, sete dias após a exposição ao (PhTe)<sub>2</sub> apresentaram uma diminuição significativa na atividade locomotora e exploratória no teste do campo aberto quando comparado ao grupo controle, indicando a prevalência de um comprometimento da locomoção espontânea mesmo uma semana depois da injúria.

A deficiência de mielina, induzido pela exposição ao (PhTe)<sub>2</sub> durante o período de mielinogênese, foi demonstrado neste estudo pela notável redução da densidade da mesma no encéfalo dos filhotes, contudo, as análises histológicas realizadas nos diferentes tecidos destes animais também apóiam a ocorrência desta desmielinização.

As análises histológicas revelaram que os filhotes de ratos expostos ao (PhTe)<sub>2</sub> apresentaram dano neuronal. Em diversas áreas do cérebro, cerebelo e medula espinhal, foram encontradas mudanças morfológicas nos neurônios, dentre elas, estão o aparecimento de: células eosinofílicas; sinais de cromatólise; perda de aparência multipolar; migração da substância de Nissl para a periferia da célula, mostrando claramente o núcleo e nucléolo com retração e hipercromasia; e neurônios com núcleo picnótico. Diversos autores têm reportado que estas mudanças poderiam preceder um estágio de necrose e/ou apoptose (Yamaoka e col., 1993; Rosenblum, 1997; McD Anderson & Opeskin, 1998).

Embora a coloração histológica utilizada nesta pesquisa não tenha sido o método mais apropriado para confirmar a desmielinização, com a análise das lâminas histológicas cerebelar, cerebral, e principalmente medular, pôde-se constatar um aumento do espaçamento endoneural entre os axônios dos filhotes expostos ao (PhTe)<sub>2</sub>, o que poderia ser interpretado, como mais um indicativo de desmielinização.

A coloração hematoxilina e eosina (HE) é com certeza a técnica mais comumente utilizada para pigmentação de lâminas histológicas. A HE são corantes adequados para evidenciar características estruturais, revelando aspectos gerais da organização dos tecidos, entretanto, eles não são capazes de revelar todos componentes celulares. Nós temos ciência de que o uso de uma coloração mais apropriada para marcar a mielina, e conseqüentemente o processo de desmielinização, é um ponto de partida indispensável para estudos subseqüentes e para a melhor caracterização do modelo de desmielinização.

Nós gostaríamos de ter realizado o método de coloração de Nissl, os corantes usados neste método poderiam apontar, com uma maior riqueza de detalhes, as mudanças

morfológicas encontradas nos neurônios, as quais foram descritas acima, e a desmielinização. Esta técnica é constituída por uma dupla coloração, onde os corantes, *luxol fast blue* e o violeta de cresil, permitem demonstrar as bainhas de mielina e os neurônios no mesmo corte de parafina. Nesta técnica, o fundo da lâmina fica claro, destacando os elementos corados. Este também é um método muito útil para revelar a arquitetura do tecido, separando bem substância cinzenta e branca. Contudo, para este estudo, a realização de tal técnica não foi possível.

Uma vez que os processos de crescimento, proliferação ou diferenciação celular, envolvem rotas metabólicas complexas, tanto a síntese quanto a manutenção da membrana de mielina dependem da disponibilidade de todos os seus constituintes nas proporções necessárias e no tempo correto. Como já mencionado anteriormente, na seção de revisão da literatura, as proteínas perfazem 30% da membrana de mielina (Van der Goes & Dijkstra, 2001), sendo que algumas proteínas da mielina são específicas da mielina do sistema nervoso periférico, enquanto outras são compartilhadas com a mielina do SNC. A proteína zero da mielina é a proteína principal, constituindo quase 50% da proteína da mielina do sistema nervoso periférico. Contudo, a mielina central é constituída de proteolípídios, proteínas básicas da mielina e outras proteínas ácidas.

Desta forma, outro método que poderia ser usado para mensurar a síntese de mielina, é o estudo da expressão de algumas destas proteínas. Uma vez que outros trabalhos indicam que quando há uma degeneração axonal, há uma *down-regulation* na expressão dos genes que codificam todos os constituintes protéicos da mielina. Por outro lado, quando há uma regeneração axonal, há uma *up-regulation* na expressão dos genes que codificam estes componentes da membrana (Gupta e col., 1988; LeBlanc & Poduslo, 1990). Isto sugere que há um controle coordenado da expressão do mRNA para diferentes componentes da membrana mielínica durante o processo de mielinização, desmielinização e remielinização (Lemke & Chao, 1988; Gupta e col., 1990; Towes e col., 1990).

A AChE desempenha um papel importante na regulação de vários eventos fisiológicos, como aprendizado, memória, organização cortical do movimento, processamento de informações sensoriais e controle do fluxo sanguíneo cerebral (Milatovic & Dettbarn, 1996; Schetinger e col., 2000). Além de seu papel clássico na transmissão colinérgica a AChE tem sido implicada em várias ações não colinérgicas como crescimento dos neuritos (Day & Greenfiel, 2002), regulação estrutural da diferenciação pós-sináptica, osteogênese (Chacón e col., 2003) e também tem sido proposto a atividade hematopoiética pela presença desta

enzima em células progenitoras do sangue (Soreq & Seidman, 2001). A AChE também foi localizada e identificada em linfócitos onde provavelmente apresenta um papel importante na regulação das funções imunes (Kawashima & Fugii, 2000). Assim uma inibição ou ativação desta enzima pode ter conseqüências devastadoras no cérebro e outros órgãos (Mesulan e col., 2002). Com isso, a ativação do sistema colinérgico foi demonstrada como sendo importante no desenvolvimento das estruturas cerebrais (Zirger e col., 2003) e interferências na neurotransmissão colinérgica durante o desenvolvimento produzem danos estruturais com efeitos no comportamento (Hohmann, e col., 1991).

Desta forma, em algumas situações neuropatológicas, alterações na atividade da AChE tem sido evidenciadas, caracterizadas por uma hiperatividade desta enzima. Assim, os inibidores da acetilcolinesterase (AChEIs) têm sido utilizados no tratamento de doenças como Alzheimer e esclerose múltipla (Parry e col., 2003; Christodoulou e col., 2006). Recentemente foi demonstrado que AChEIs possuem propriedades anti-inflamatórias, reduzindo a proliferação de linfócitos e secreção de citocinas pró-inflamatórias (Nizri e col., 2006) provendo assim, uma melhora na integridade da mielina pela estimulação colinérgica de oligodendrócitos em humanos (Bartzokis, 2007).

Neste estudo, a atividade da AChE foi aumentada no 4º e 5º dias pós a exposição ao (PhTe)<sub>2</sub>, coincidindo com a fase inicial da desmielinização, desta forma, sugere-se que a integridade da mielina pela estimulação colinérgica, estava prejudicada. Com este resultado, fica evidenciado, que de alguma forma, o sistema colinérgico está associado ao processo de desmielinização induzido pelo (PhTe)<sub>2</sub> em filhotes de ratos. O aumento da atividade da AChE pode ter sido aumentada neste protocolo experimental por diversos fatores, entretanto uma explicação plausível para este evento seria uma tentativa do SNC de compensar o dano causado pelo Te, uma vez que a AChE tem participação importante no crescimento cerebral.

Por fim, os filhotes de ratos expostos ao (PhTe)<sub>2</sub> apresentaram diversos sinais característicos de toxicidade induzidos pelo Te, incluindo alterações comportamentais de caráter sensório-motor. O (PhTe)<sub>2</sub> causou desmielinização no SNC dos filhotes de ratos expostos a este composto, prejudicando o desenvolvimento normal destes animais. As análises histológicas confirmaram que (PhTe)<sub>2</sub> induziu neurotoxicidade em filhotes de ratos. Além disso, conclui-se, que o aumento da atividade da AChE esteve relacionada com o período crítico da desmielinização.

## **PARTE V**

---

## 5. CONCLUSÕES

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

1. Os filhotes de ratos expostos ao  $(\text{PhTe})_2$  no 14º PND apresentaram diversos sinais gerais de toxicidade, como: perda de peso corporal; perda de pêlos, exalação de odor gárlico; tremores; diarreia; e paralisia dos membros pélvicos.
2. Prejuízos no comportamento sensório-motor dos filhotes expostos ao  $(\text{PhTe})_2$  também foram observados, devido as alterações verificadas na performance destes animais na execução das tarefas nos testes da geotaxia negativa, de sustentação na barra e no campo aberto.
3. O  $(\text{PhTe})_2$  causou desmielinização no SNC de filhotes de ratos, esta perda das membranas de mielina foi constatada pela quantificação da densidade da mesma no encéfalo destes animais.
4. As análises histológicas revelaram que os filhotes de ratos expostos ao  $(\text{PhTe})_2$  apresentaram dano neuronal, diversas alterações morfológicas foram encontradas nos neurônios, dentre elas, estão o aparecimento de: células eosinofílicas; sinais de cromatólise; perda de aparência multipolar; migração da substancia de Nissl para a periferia da célula, mostrando claramente o núcleo e nucléolo com retração e hiper cromasia; e neurônios com núcleo picnótico.
5. Por fim, o  $(\text{PhTe})_2$  induziu um aumento na atividade da AChE no córtex cerebral, a atividade desta enzima esteve aumentada durante a fase inicial da desmielinização, indicando um possível envolvimento entre o sistema colinérgico e o processo desmielinizante.

Desta forma, conclui-se que o  $(\text{PhTe})_2$  induz desmielinização no SNC de filhotes de ratos Wistar causando diversos prejuízos desenvolvimentais e neurotoxicidade. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar se a intoxicação à este organotelúrio consistiria em um modelo experimental de desmielinização.

## **PARTE VI**

---

## 6. PESPECTIVAS

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

- Ampliar o tempo de observação dos efeitos causados pelo (PhTe)<sub>2</sub> em filhotes de ratos, com a finalidade de se observar uma possível remielinização do SNC;
- Realizar análises histológicas com coloração específica para a membrana de mielina, usando *luxol fast blue*, com o intuito de caracterizar melhor o modelo de desmielinização e a provável remielinização;
- Para melhor observar o dano neuronal induzido pelo (PhTe)<sub>2</sub>, realizar novas análises histológicas usando a coloração de violeta de cresil;
- Investigar mais profundamente o feito do (PhTe)<sub>2</sub> e da desmielinização sobre a atividade das colinesterases;

## **PARTE VII**

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTMAN, J., DAS, G.D. 1966. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of kinetics migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. **J. Comp. Neurol.**, 126, 337.

ANNAU, Z., CUOMO, V. 1988. Mechanisms of neurotoxicity and their relationship to behavioral changes. **Toxicology**, 49, 219–225.

BARBARIA, E.M., KOHL, B., BUHREN, B.A., HASENPUSCH-THEIL, K., KRUSE, F., KÜRY, P., MARTINI, R., MÜLLER, H.W., 2009. The  $\alpha$ -chemokine CXCL14 is up-regulated in the sciatic nerve of a mouse model of Charcot–Marie–Tooth disease type 1A and alters myelin gene expression in cultured Schwann cells. **Neurobiol Dis.**, 33,448-458.

BARBOSA, N.B.V., Rocha, J.B.T., Zeni, G., Emanuelli, T., Beque, M.C., Braga, A.L. 1998. Effect of organic forms of selenium on  $\delta$ -aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 149, 243-253.

BARTZOKIS, G. 2007. Acetylcholinesterase inhibitors may improve myelin integrity. **Biol. Psychiatry**, 62, 294–301.

BEAR, M.F., CONNORS, B.W., PARADISO, M.A. 2002. Neurociências: desenvolvendo o sistema nervoso. (2ª ed.). Porto Alegre: Artmed.

BLAIS, F.X., ONISCHUK, R.T., DE MEIO, R.H. 1972. Hemolysis by tellurite: I: The tellurite test for hemolysis. **J. AOA**, 73.

BLAKEMORE, W.F., EAMES, R.A., SMITH, K.J., McDONALD, W.I. 1977. Remyelination in the spinal cord of the cat following intraspinal injections of lysilecithin. **J. Neurol. Sci.**, 33, 31-43.

BLINZINGER, K.; HAGER, H. 1965. Über die zellulare Speicherung von Tellur und ihre Beziehung zu den unter dem Lysosomenbegriff zusammengefassten intrazytoplasmatischen

Korpern. **Verh. Deut. Ges. Pathol.**, 49, 357-362.

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

BRUSQUE, A.M., ROTTA, L., PETTENUZZO, L.F., JUNQUEIRA, D., SCHWARZBOLD, C.V., WYSE, A.T., WANNMACHER C.M.D., DUTRA FILHO, C.S., WAJNER, M. 2001. Chronic postnatal administration of methylmalonic acid provokes a decrease of myelin content and ganglioside N-acetylneuraminic acid concentration in cerebrum of young rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 34, 227-231.

CARLTON, W.W., KELLY, W.A. 1967. Tellurium toxicosis in Pekin ducks. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 2, 203-214.

CHACON, M.A., REYES, A.E., INESTROSA, N.C. 2003. Acetylcholinesterase induces neuronal cell loss, astrocyte hypertrophy and behavioral deficits in mammalian hippocampus. **J. Neurochem.**, 15, 87-91.

CHRISTODOULOU, C., MELVILLE, P., SCHERL, W.F., MC ALLISTER, W.S., ELKINS, L.E., KRUPP, L.B., 2006. Effects of donepezil on memory and cognition in multiple sclerosis. **J. Neurol. Sci.** 245, 127-136.

CLIFFORD-JONES. R.E., McDONALD, W.I., LANDON, D.N. 1985. Chronic optic nerve compression. An experimental study. **Brain**, 108, 241-262.

COMASSETO, J. V., Ling, L.W., Petragani, N., Stefani, H.A. 1997. Vinylic selenides and tellurides – preparations, reactivity and synthetic applications. **Synthesis**, 373.

CROSKERRY, P.G., SMITH, G.K., SHEPARD, B.I., FREEMAN, K.B. 1973. Perinatal brain DNA in normal and growth hormone-treated rat. **Brain Res.**, 52, 413-418.

CROZIER, W.J., PINCUS, G. 1926. The geotropic conduct of young rats. **J. Gen. Physiol.**, 10, 257-269.

DAVISON, A.N., DOBBIN, J. 1966. Myelination as a vulnerable period in brain development. **Brit. Med. Bull.**, 22, 40.

DAY, T., GREENFIELD, S. A. 2002. A non-cholinergic, trophic action of acetylcholinesterase on hippocampal neurones in vitro: molecular mechanisms. **Neuroscience**, 111, 649-656.

DEUTICKE, B., LÜTKEMEIER, P., POSE, B. 1992. Tellurite-induced damage of the erythrocyte membrane. Manifestations and mechanisms. **Biochem. Biophys. Acta**, 1109, 97-107.

DOBBING, J., SANDS, J. 1971. Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growthspurt. **Biol. Neonate.**, 19, 363-378.

DOERING, A., YONG, V.W., 2008. Characterization of lysolecithin-induced demyelination, with a focus on the early inflammatory responses and their possible roles. **J. Neuroimmunol.**, 203, 247-247.

DUCKET, S., SAID, G., STRELETZ, L.G., WHITE, R.G., GALLE, P. 1979. Tellurium-induced neuropathy. Correlative physiological, morphological and electron microprobe studies. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, 5, 265-278.

DUCKETT, S. 1972. Teratogenesis caused by tellurium. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 192, 220-226.

DUCKETT, S., SAID, G., STRELETZ, L.G., WHITE, R.G., GALLE, P., 1979. Tellurium-induced neuropathy. Correlative physiological, morphological and electron microprobe studies. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** 5, 265-278.

DUCKETT, S., ELLEM, K.A.O. 1971. The location of tellurium in fetal tissues, particularly the brain. **Exp. Neurol.**, 32, 49-71.

DUCKETT, S., WHITE, R. 1974. Cerebral lipofuscinosis induced with tellurium: electron dispersive x-ray spectrophotometry analysis. **Brain Res.**, 73, 205-214.

FAIRHILL, L.T. 1969. Tellurium. In: **Industrial Toxicology**. Hafner Publishing Co, New York & London, pp.120.

FLEURY, H.J.A., SHEPPARD, R.D., BORNSTEIN, M.B., RAINE, C.S. 1980. Further ultrastructural observations of virus morphogenesis and myelin pathology in JHM encephalomyelitis. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, 6, 165-179.

FONSECA, V. 1988. Da filogênese à ontogênese da motricidade. Porto Alegre: Artes Médicas, pp. 309.

FOX, W.M., 1965. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Anim. Behav.**, 13, 234-241.

FRY, J.M., WEISSBARTH, S., LEHRER, G.M., BORNSTEIN, M.B. 1974. Cerebroside antibody inhibits sulfatide synthesis and myelination and demyelinate in cord tissue cultures. **Science**, 183, 540-542.

GENN, R.F., TUCCI, S.A., THOMAS, A., EDWARDS, J.E., FILE, S.E. 2003. Age associated sex differences in response to food deprivation in two animal tests of anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 27, 155–161.

GOTTLIEB, A., KEYDAR, I., EPSTEIN, H.T. 1977. Rodent brain growth stages: an analytical review. **Neonate**, 32, 166-176.

GOTTI, C., CLEMENTI, F. 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. **Prog Neurobiol.**, 74, 363-396.

GRAÇA, D.L., BONDAN, E.F., PEREIRA, L.A.V.D., FERNANDES, C.G., MAIORKA, C.P., 2001. Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. **Arq. Neuropsiquiat.**, 59, 358-361.

GRAEFF, F.G., NETTO, F.C., ZANGROSSI, H. 1998. The elevated T-maze as an experimental model of anxiety. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 23, 237–246.

GREEN, M., Harwood, H., Barrowman, C., Rahman, P., Eggeman, A., Festry, F., Dobsonb,

P., Ng, T. 2007. A facile route to CdTe nanoparticles and their use in bio-labelling. **J. Mater. Chem.**, 17, 1989–1994.

GRIFFIN, J.W., HOFFMAN, P.N. 1993. Degeneration and regeneration in the peripheral nervous system. *Peripheral neuropathy* (3<sup>rd</sup> ed.). Philadelphia: W.B. Saunders, pp. 361-376.

GUDI, V., MOHARREGH-KHIABANI, D., SKRIPULETZ, T., KOUTSOUDAKI, P.N., KOTSIARI, A., SKULJEC, J., TREBST, C., STANGEL, M., 2009. Regional differences between grey and white matter in cuprizone induced Demyelination. **Brain Res.**, 1283, 127-138.

GUPTA, S.K., PODUSLO, J.F., MEZEI, C. 1988. Temporal changes in P0 and MBP gene expression after crush-injury of the adult peripheral nerve. **Mol. Brain. Res.**, 4, 133–141.

GUPTA, S.K., PODUSLO, J.F., DUNN, R., RODER, J., MEZEI, C. 1990. Myelin-associated glycoprotein gene expression in the presence and absence of Schwann cell-axonal contact. **Dev. Neurosci.**, 12, 22–30.

HARRISON, B.M., McDONALD, W.I. 1977. Remyelination after transient experimental compression of the spinal cord. **Annals Neurology**, 1, 542-551.

HARRY, G.J., GOODRUM, J.F., BOULDIN, T.W., WAGNER-RECIO, M., TOEWS, A.D., MORELL, P. 1989. Tellurium-induced neuropathy: metabolic alterations associated with demyelination and remyelination in rat sciatic nerve. **J. Neurochem.**, 52, 938-945.

HAUW, J.J., DELAÉRE, P., SEILHEAN, D., CORNU, P. 1992. Morphology of demyelination in the human central nervous system. **J. Neuroimmunol.**, 40, 139-152.

HIRANO, A., LEVINE, S., ZIMMERMAN, H.M. 1968. Remyelination in the central nervous system after cyanide intoxication. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, 27, 234-245.

HOHMANN, C.F., WILSON, L., COYLE, J.T. 1991. Efferent and afferent connections of mouse sensory-motor cortex following cholinergic differentiation at birth. **Cereb. Corte.**, 1, 1158-1172.

HUGHES, R.A.C, CORNBLATH, D.R. 2005. Guillain-Barré syndrome. **Lancet**, 366, 1653-

1666.

JACKSON, K.F., HAMMANG, J.P., WORTH, S.F., DUNCAN, I.D. 1989. Hypomyelination in the neonatal rat central and peripheral nervous systems following tellurium intoxication. **Acta Neuropathol.**, 78, 301-309.

JAVED, A., REDER, A. 2005. Therapeutic role of beta - interferons in multiple sclerosis. **Pharmacol. Therapeut.**, 110, 35-56.

KAWASHIMA, K., FUJII, T. 2000. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacol. Therapeut.**, 86, 29-48.

KOLB, B., WHISHAW, I. Q. 2002. Neurociência do comportamento. Barueri, SP: Manole.

KUSAKA, H., HIRANO, A., BORNSTEIN, M.B., RAINE, C.S. 1985. Fine structure of astrocytic processes during serum-induced demyelination in vitro. **J. Neurol. Sci.**, 69, 255-267.

LADEN, B., PORTER, T., 2001. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds. Evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. **J. Lipid. Res.**, 42, 235-240.

LALONDE, R., QIAN, S., STRAZIELLE, C. 2003. Transgenic mice expressing the PSIA346E mutation: effects on spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination. **Behav. Brain Res.**, 138, 71-79.

LAMPERT, P., GARRETT, R.S. 1970. Mechanism of demyelination in tellurium neuropathy. Electron microscopic observations. **Lab. Invest.**, 25,380-388.

LAMPERT, P., GARBO, F., PENTSCHEW, A., 1970. Tellurium Neuropathy. **Acta Neuropathol.**, 15, 308-317.

LAMPERT, P., GARRETT, R.S., 1971. Mechanism of demyelination in tellurium neuropathy: Electron microscopic observations. **Lab. Invest.**, 25, 380-388.

LARNER, A.J. 1995. How does garlic exert its hypocholesterolaemic action? The tellurium

hypothesis. **Med. Hypothesis.**, 44, 295-297.

LAZZARINI, R. 2004. Myelin Biology and Disorders. 1 ed., v I/II. Estados Unidos: Elsevier Academic Press.

LEBLANC, A.C., PODUSLO, J.F. 1990. Axonal modulation of myelin gene expression in the peripheral nerve. **J. Neurosci. Res.**, 26, 317–326.

LEMKE, G., CHAO, M. 1988. Axons regulate Schwann cell expression of the major myelin and NGF receptor genes. **Development**, 102, 499–504.

MAZZANTI, C.M., SPANEVELLO, R., AHMED, M., SCHMATZ, R., MAZZANTI, A., SALBEGO, F.Z., GRAÇA, D.L., SALLIS, E.S.V., MORSCH, V.M., SCHETINGER, M.R.C., 2007. Cyclosporine A inhibits acetylcholinesterase activity in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. **Int. J. Devl. Neurosc.**, 25, 259-264.

McD ANDERSON, R., OPESKIN, K., 1998. Timing of early changes in brain trauma. **Am. J. Forensic. Med. Pathol.**, 19, 1-9.

MEOTTI, F.C., Borges, V.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W. 2003. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicol. Lett.**, 143, 9-16.

MESULAM, M.M., GUILLOZET, A., SHAW, P., LEVEY, A. 2002. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. **Neuroscience**, 110, 627-639.

MILATOVIC, D., DETTBARN, W.D., 1996. Modification of acetylcholinesterase during adaptation to chronic, subacute paraoxon application in rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 136, 20-28.

MIZUNO, R. 1969. Electron microscopic study on the cerebral cortex of rabbits intoxicated with tellurium. **Yokohama Med. J.**, 20, 101-121.

- MORELL, P., TOEWS, A.D., WAGNER, M., GOODRUM, J.F., 1994. Gene expression during tellurium-induced primary demyelination. **Neurotoxicology**, 15, 171-180.
- MORETTO, M.B., ROSSATO, J.I., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., 2003. Ebselen and diorganochalcogenides inhibition of  $45\text{Ca}^{2+}$  influx into brain synaptosomes is voltage-dependent. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, 17, 154-160.
- MORETTO, M.B., BOFF, B., FRANCO, J., POSSER, T., ROESSLER, T.T, SOUZA, D.O., NOGUEIRA, C.W., WOFCHUK, S., ROCHA, J.B. 2007. Ca-45(2+) influx in rat brain: Effect of diorganylchalcogenides compounds **Toxicol. Sci.**, 99, 566-571.
- MORGANE, P.J., MOKLER, D.J., GALLER, J.R. 2002. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, 26, 471-483.
- MÜLLER, R., Zschiesche, W., Steffen, H., Schaller, K. 1989. Tellurium intoxication. **Kiln. Wocherschr.**, 67, 1152-1155.
- NIZRI, E., HAMRA-AMITAY, Y., SICSIC, C., LAVON, I., BRENNER, T., 2006. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, 50, 540-547.
- 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., ROTTA, L.N., ZENI, G., SOUZA, D.O., ROCHA, J.B.T., 2002. Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. **Neurochem. Res.**, 27, 283-288.
- NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and Pharmacology. **Chem. Rev.**, 104, 6255-6286.
- NORTON, W.T. 1981. Formation, structure and biochemistry of myelin. Basic Neurochemistry (3<sup>rd</sup> ed.). Boston: Litle, Mrawn and Company.

PARRY, A.M.M., SCOTT, R.B., PALACE, J., SMITH, S., MATTHEWS, P.M., 2003. Potentially adaptive functional changes in cognitive processing for patients with multiple sclerosis and their acute modulation by rivastigmine. **Brain**, 126, 2750-2760.

PENTSCHEW, A., EBNER, F., KOVATCH, R. 1962. In: Proceedings of Fourth International Congress of Neuropathology. H. Jacobs, Ed. 3:300. George Thieme Verlag. Stuttgart, Germany.

PETRAGNANI, N. 1995. In: **comprehensive Organometallic Chemistry II** (Ed. A. Mckillop), vol. LI, Pergamon Press, Exeter, UK.

RADTKE, C., SPIES, M., SASAKI, M., VOGT, P.M., KOCSIS, J.D. 2007. Demyelinating diseases and potential repair strategies. **Int. J. Dev. Neurosci.**, 25, 149-53.

RAWLINS, F.A., SMITH, M.E. 1971. Myelin synthesis in vitro: a comparative study of central and peripheral nervous tissue. **J. Neurochem.**, 18, 1861-1870.

REIPERT, B. 2004. Multiple sclerosis: a short review of the disease and its differences between men and woman. **The International Journal on Men's Health and Gender**, 1, 334-340.

RICE, D.C. 1999. Effect of exposure to 3,3,4,4,5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) throughout gestation and lactation on developmental and spatial delayed alternation performance in rats. **Neurotoxicol. Teratol.**, 21, 59-69.

ROCINHOLI, L.F., ALMEIDA, S.S., DE-OLIVEIRA, L.M. 1997. Response threshold to aversive stimuli in stimulated early protein-malnourished rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 30, 407-413.

ROMAN, S.S., NAVA, A., FAVERO, A.M., WEIS, S.N., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. 2007. Diphenyl ditelluride effect on embryo/fetal development in mice: Interspecies differences. **Toxicology**, 231, 243-249.

ROSENBLUM, W.I., 1997. Histopathologic clues to the pathways of neuronal death following ischemia/hypoxia. **J. Neurotrauma**, 14, 313-326.

SCHETINGER, M.R.C., PORTO, N.M., MORETTO, M.B., MORSCH, V.M., ROCHA, J.B.T., VIEIRA, V., MORO, F., NEIS, R.T., BITTENCOURT, S., BONACORSO, H.G., ZANATTA, N., 2000. New benzodiazepines alter acetylcholinesterase and ATPase activities. **Neurochem. Res.**, 25, 949-955.

SIEGEL, G. 1999. Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. 6 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1183.

SOREQ, H., SEIDMAN, S. 2001. Acetylcholinesterase – news roles for an old actor. **Nat. Rev. Neurosci.**, 2, 294-302.

STANGHERLIN, E.C., FAVERO, A.M., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., 2005. Teratogenic vulnerability of rat fetuses to diphenyl ditelluride: prenatal assessment. **Toxicology**, 20, 231-239.

STANGHERLIN, E.C., FAVERO, A.M., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., 2006. Exposure of mothers to diphenyl ditelluride during the suckling period changes behavioral tendencies in their offspring. **Brain Res. Bull.**, 69, 311-317.

STANGHERLIN, E.C., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. 2009a. Diphenyl ditelluride impairs short-term memory and alters neurochemical parameters in young rats. **Pharmacol. Biochem. Beh.**, 91, 430-435.

STANGHERLIN, E.C., ARDAIS, A.P., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W. 2009b. Exposure to diphenyl ditelluride, via maternal milk, causes oxidative stress in cerebral cortex, hippocampus and striatum of young rats **Arch. Toxicol.**, 83, 485-491.

STEWART, N. G., CROOKS, R. N. 1958. Long-range travel of the radioactive cloud from the accident at Windscale. **Nature**, 182, 627-628.

SUTHERLAND, R.J., RUDY J.W. 1989. Configural association theory: the role of the hippocampal formation in learning, memory and amnesia. **Psychobiology**, 17, 129-144.

SUZUKI, K., ZARAGOREN, J.C. 1974. Degeneration of oligodendroglia in the central nervous system of rats treated with AY9944 or tripanol. **Lab. Invest.**, 31, 503- 505.

- TAYLOR, A. 1996. Biochemistry of tellurium. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 55, 231-239.
- TOEWS, A.D., HOSTETTLER, J., BARRETT, C., MORELLI, P., 1997. Alterations in gene expression associated with primary demyelination and remyelination in the peripheral nervous system. *Neurochem. Res.*, 22, 1271-1280.
- TOEWS, A.D., LEE, S.Y., POPKO, B., MORELL, P. 1990. Tellurium-induced neuropathy: a model for reversible reductions in myelin gene expression. *J. Neurosci. Res.*, 26, 501-507.
- U.S. Bureau of Mines, 1985. Mineral Year Book. U.S. Government Printing Office, Vol. I, pp. 1018-1021. Washington D.C.
- VAN DER GOES, A., DIJKSTRA, C.D. 2001. Models of demyelination. In: López, B.C., Sampedro, M.N. Glial Cell Function. Amsterdam: Elsevier, 13, pp. 149-153
- 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.
- WAGNER-RECIO, M., TOEWS, A.D., MORELL, P. 1994. Tellurium blocks cholesterol synthesis by inhibiting squalene metabolism: Preferential vulnerability to this metabolic block leads to peripheral nervous system demyelination. *J. Neurochem.*, 57, 1891-1901.
- WEINER, W.J., GOETZ, C.G. 2003. Neurologia para o não-especialista: fundamentos básicos de neurologia contemporânea, 4ª ed. São Paulo: Livraria Santos, 69-83.
- WIGGINS, R.C., KONAT, G.W. 1994. Experimental models of environmental dysmyelination and demyelination in: Developmental Neurotoxicology, Chapter 3, CRC Press, pp. 33-41.
- YAMAOKA, Y., SHIMOHAMA, S., KIMURA, J., FAKUNAGA, R., TANIGUCHI, T., 1993. Neuronal damage in the rat hippocampus induced by in vivo hypoxia. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 45, 205-209.
- YAREMA, M.C., CURRY, S.C. 2005. Acute tellurium toxicity from ingestion of metal-oxidizing solutions. *Pediatrics*, 116, 319-321.

YOUNG, V. R., NAHAPETIAU, A., JONGHORBONI, M. 1981. Selenium bioavailability with reference to human nutrition. **American J. Clin. Nutrition**, 35, 1076-1088.

ZENI, G., LUDTKE, D.S., PANATIERI, R.B., BRAGA, A.L., 2006. Vinylic Tellurides: From Preparation to their Applicability in Organic Synthesis. **Chem. Rev.**, 106, 1032-1076.

ZHANG, H., SWIHART, M.T. 2007. Synthesis of Tellurium Dioxide Nanoparticles by Spray Pyrolysis. **Chem. Mater.**, 19, 1290-1301.

ZIRGER, J.M., BEATTIE, C.E., MCKAY, D.B., BOYD, R.T. 2003. Cloning and expression of zebrafish neuronal nicotinic acetylcholine receptors. **Gene Expr. Patterns.**, 3, 747-754.

## APÊNDICE

*Demais trabalhos desenvolvido durante o Curso de Mestrado:*

Simone Pinton, Cristiane Luchese, Eluza C. Stangherlin, Cristina W. Nogueira “Acute exposure to diphenyl ditelluride causes oxidative damage in rat lungs” *Ecotoxicology and Environmental Safety* (Submetido, em processo de avaliação).

Simone Pinton, Cristiane Luchese, Cristina W. Nogueira “Comparison of the antioxidant properties and the toxicity of *p,p'*-dichlorodiphenyl ditelluride to those of the parent compound, diphenyl ditelluride” *Biological Trace Element Research* (Submetido, em processo de avaliação).

Simone Pinton, Marina Prigol, Bibiana Mozzaquatro Gay, Juliana Trevisan da Rocha, Gilson Zeni and Cristina Wayne Nogueira. “Glutamatergic modulation and involvement of  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase activity in streptozotocin mice model of sporadic dementia of Alzheimer's type (SDAT)” ( em fase de redação).

Marina Prigol, Cristiane Luchese, Simone Pinton, Cristina Wayne Nogueira. “Anxiolytic-like effect of diphenyl diselenide on the chick social separation-stress behavior” *Applied Animal Behaviour Science* (Submetido, em processo de avaliação).

Mohammad Ibrahim, Cristiane Luchese, Simone Pinton, Silvane S. Roman, Waseem Hassan, Cristina W. Nogueira and João B. T. Rocha “Involvement of Catalase in the Protective Effect of Binaphthyl Diselenide Against Renal Damage Induced by Glycerol” *Experimental and Toxicologic Pathology* (Submetido, em processo de avaliação).

Marina Prigol, Simone Pinton, Ricardo Schumacher, Cristina Wayne Nogueira, Gilson Zeni “Convulsant action of diphenyl diselenide in rat pups: Measurement and correlation with plasma, liver and brain levels of compound” *Archives of toxicology* (Submetido, em processo de avaliação).

Rocha, J. T., Pinton, S., Zeni, G., Nogueira, C. W. “Organoselenium improves memory

decline in mice: Involvement of acetylcholinesterase activity”. *Neuroscience Letters* (Submetido, em processo de avaliação).

Luchese, C., Pinton, S., Nogueira, C. W. “Brain and Lungs of Rats are Differently Affected by Cigarette Smoke Exposure: Antioxidant Effect of an Organoselenium Compound” *Pharmacological Research* 2009, 59, 194-201 (Publicado).

Borges, V.C., Savegnago, L., Pinton, S., Jesse, C.R., Alves D., Nogueira, C.W. “Vinilyc telluride derivatives as promising pharmacological compounds with low toxicity”. *JAT* 2008, 1147, 226-232 (Publicado).

Eluza Curte Stangherlin, Cristiane Luchese, Simone Pinton, Joao Batista Teixeira Rocha, Cristina Wayne Nogueira. “Sub-chronical exposure to diphenyl diselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats”. *Brain Research* 2008, 1201,106-113 (Publicado).