

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

**EFEITO ANTIOXIDANTE DE UMA NOVA CLASSE DE
COMPOSTOS TELUROACETILENOS: ESTUDOS *IN
VITRO* E *IN VIVO***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Ana Cristina Guerra de Souza

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**EFEITO ANTIOXIDANTE DE UMA NOVA CLASSE DE
COMPOSTOS TELUROACETILENOS: ESTUDOS *IN VITRO* E
*IN VIVO***

por

Ana Cristina Guerra de Souza

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristina Wayne Nogueira

Santa Maria, RS, Brasil
2010

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

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

**EFEITO ANTIOXIDANTE DE UMA NOVA CLASSE DE COMPOSTOS
TELUROACETILENOS: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

elaborada por
Ana Cristina Guerra de Souza

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Cristina Wayne Nogueira, Dr^a
(Presidente/Orientadora)

Ana Flávia Furian, Dr^a (UNIPAMPA)

Roselei Fachinetto, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 01 de abril de 2010.

*A meus queridos pais,
Flavio e Ilda,
que sempre foram meus melhores amigos,
dedico este trabalho e todo o meu amor!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelo amor, por iluminar meu caminho e por todas as graças concedidas.

Aos meus pais, por todo amor, dedicação, apoio e por todos os ensinamentos. Por abrir mão de tantas coisas para ficar ao meu lado e sempre me proporcionar o melhor. Ao meu irmão Cesar, por ser a pessoa maravilhosa que és. A meus queridos Dindos, tios e primos por toda força. Amo vocês!

Ao Rodriguinho, meu amorzinho, por estar sempre ao meu lado, me incentivando e ser tão especial na minha vida. Te amo!

Às minhas queridas amigas Cissa e Fe tão importantes para mim, obrigada pela força!

À minha orientadora Cristina, pela sabedoria, competência, honestidade, por ter me recebido com tanto carinho no laboratório. Agradeço por todos os ensinamentos, por toda ajuda, incentivo e dedicação. Cris, muito obrigada por tudo!

Ao GZ, pelo carinho, dedicação, competência, pela amizade e por todos os momentos divertidos no laboratório.

A todo pessoal do laboratório do professor GZ, pela amizade e companheirismo, em especial ao Zé pela síntese dos teluroacetilenos.

À Bibi, minha amiga de todas as horas, companheira desde a graduação. Obrigada pelos conselhos, incentivo, carinho e a amizade. Te adoro muito!

A meus queridos colegas do laboratório, Carmine, Ethel, Simone, Juliana, Cristiano, Marina, Silvane e Michael. E aos ICs, César, Crisinha, Marlon, Pietro, Maurício, Carlinha e Xorão. Obrigada pela amizade, por toda ajuda, por serem ótimos colegas, importantes para minha formação.

Agradeço também aos amigos que não estão mais no laboratório, mas que me proporcionaram muitos conhecimentos, Fran, Eluza, Lucielli, Ricardo e Cristiane, guardo muitas lembranças boas de vocês. Cris, obrigada por toda ajuda, dedicação, por me auxiliar na realização deste trabalho.

Aos professores João, Nilda e Félix e todos os seus alunos.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização desse curso.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

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

EFEITO ANTIOXIDANTE DE UMA NOVA CLASSE DE COMPOSTOS TELUROACETILENOS: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

AUTORA: ANA CRISTINA GUERRA DE SOUZA
ORIENTADORA: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 2010

Compostos orgânicos de telúrio apresentam propriedades antioxidantes em muitos modelos de estresse oxidativo, principalmente no cérebro. Este estudo investigou o efeito de compostos teluroacetilenos **a-d** em testes farmacológicos *in vitro*. Um segundo objetivo deste trabalho foi investigar a ação antioxidante do composto **b** contra o dano oxidativo induzido por nitroprussiato de sódio (SNP) em cérebro de camundongos. Nos experimentos *in vitro*, os níveis de peroxidação lipídica (PL) e proteína carbonilada (PC) e a atividade da δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D) foram determinados em homogeneizado de cérebro de rato. Para estudar o mecanismo pelo qual os teluroacetilenos apresentaram efeito antioxidante, verificou-se o efeito mimético destes compostos na atividade das enzimas glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona S-transferase (GST) e o efeito protetor na auto-oxidação do Fe^{2+} . Além disso, estudou-se o efeito dos teluroacetilenos **a-d** como *scavenger* dos radicais 2,2'-difetil-1-picril-hidrazil (DPPH $^{\bullet}$) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS $^{++}$) e o efeito *scavenger* de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Nos experimentos *in vivo*, camundongos receberam SNP (0,335 $\mu\text{mol per site}$) intracerebroventricular (i.c.v.) trinta minutos após a administração oral de teluroacetileno **b** (10 mg/kg). Após uma hora, os animais foram submetidos à eutanásia e foram determinados os níveis de PL e as atividades das enzimas δ -ALA-D, GPx, GST, catalase (CAT) e glutaciona redutase (GR) no cérebro de camundongos. Os teluroacetilenos **a-d**, em baixas concentrações, reduziram os níveis de PL e PC no homogeneizado de cérebro de rato. Os teluroacetilenos **a-d** apresentaram efeito *scavenger* de radicais DPPH $^{\bullet}$ e ABTS $^{++}$, bem como efeito *scavenger* de H_2O_2 . Entretanto, os compostos não apresentaram efeito mimético da atividade das enzimas GPx e GST, nem efeito protetor contra a auto-oxidação do Fe^{2+} , descartando que estes mecanismos estariam envolvidos na ação antioxidante dos teluroacetilenos **a-d**. A atividade da δ -ALA-D foi inibida pelos teluroacetilenos **a-d** em homogeneizado de cérebro de ratos somente em concentrações maiores do que as necessárias para o efeito antioxidante. Nos experimentos *in vivo*, os cérebros dos camundongos tratados com SNP apresentaram um aumento nos níveis de PL e inibição na atividade das enzimas δ -ALA-D, GR e GST. O teluroacetileno **b** protegeu contra o estresse oxidativo causado pelo SNP em cérebro de camundongos. Ainda, o teluroacetileno **b** aumentou *per se* a atividade da GPx em cérebro de camundongos. Estes resultados comprovam o efeito antioxidante dos teluroacetilenos **a-d in vitro**. Além disso, o teluroacetileno **b** protegeu contra o dano oxidativo causado pelo SNP em cérebro de camundongos, demonstrando o efeito antioxidante deste composto *in vivo*.

Palavras-chave: Telúrio, Peroxidação lipídica, Antioxidante, Cérebro, Nitroprussiato de sódio.

ABSTRACT

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

ANTIOXIDANT EFFECT OF A NOVEL CLASS OF TELLUROACETYLENE COMPOUNDS: STUDIES *IN VITRO* AND *IN VIVO*

AUTHOR: ANA CRISTINA GUERRA DE SOUZA
ADVISOR: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA
Date and Place of the defense: Santa Maria, 2010

Organotellurium compounds have been reported as antioxidants in several models of oxidative stress, especially in the brain. This study investigated the effect of telluroacetylenes **a-d** on pharmacological assays *in vitro*. A second objective of this study was to investigate the antioxidant action of compound **b** against the oxidative damage induced by sodium nitroprusside (SNP) in mouse brain. In *in vitro* experiments, lipid peroxidation (LP) and protein carbonyl (PC) levels and δ -aminolevulinatase (δ -ALA-D) activity were carried out in rat brain homogenate. The mechanisms involved in the antioxidant effect of telluroacetylenes **a-d** were studied. The glutathione peroxidase (GPx)-like activity, glutathione S-transferase (GST)-like activity and the protection against Fe^{2+} autooxidation were determined. Furthermore, the scavenger effect of 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH \cdot) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS $^{++}$) radicals and hydrogen peroxide (H_2O_2) were investigated. In *in vivo* experiments, mice received SNP (0.335 μmol per site) intra cerebroventricular (i.c.v.) thirty minutes after oral administration of telluroacetylene **b** (10 mg/kg). After 1 h, animals were euthanized. The levels of LP and δ -ALA-D, GPx, GST, catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) activities were carried out in mouse brain homogenate. Telluroacetylenes **a-d**, at low μM range, reduced LP and PC levels in rat brain homogenate. Telluroacetylenes **a-d** showed effect of scavenging DPPH \cdot and ABTS $^{++}$ radicals and H_2O_2 . However the compounds had no GPx-like and GST-like activities or protected against Fe^{2+} autooxidation, discarding that these mechanisms are involved in the antioxidant effect of telluroacetylenes **a-d**. δ -ALA-D activity was inhibited by telluroacetylenes **a-d**, at high μM range, in rat brain homogenate. In the *in vivo* experiments, brains of mice treated with SNP showed an increase in LP and the reduction in δ -ALA-D, GR and GST activities. Telluroacetylene **b** protected against the oxidative stress caused by SNP in brain of mice. Moreover, telluroacetylene **b** increased *per se* GPx activity in brains of mice. The results support an antioxidant effect of telluroacetylenes **a-d** *in vitro*. Telluroacetylene **b** protected against oxidative damage caused by SNP in mouse brain, suggesting an antioxidant effect of this compound *in vivo*.

Keywords: Tellurium, Lipid peroxidation, Antioxidant, Brain, Sodium nitroprusside.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

TABELA 1 - Effect of telluroacetylene compounds a-d on TBARS levels induced by malonate in rat brain homogenate	21
TABELA 2 - Effect of telluroacetylene compounds a-d on TBARS levels induced by SNP in rat brain homogenate.....	22
TABELA 3 - Effect of telluroacetylene compounds a-d on protein carbonyl content induced by SNP in rat brain homogenate	22
TABELA 4 - Scavenging effect of telluroacetylene compounds (a-d) on DPPH [•] radicals	22
TABELA 5 - Effect of telluroacetylene compounds a-d on δ -ALA-D activity in rat brain homogenate	22

Capítulo 2

TABELA 1 - Efeito <i>scavenger</i> de radical ABTS ^{•+} pelos compostos teluroacetilenos a-d e ácido ascórbico	29
TABELA 2 - Efeito dos compostos teluroacetileno a-d na auto-oxidação de ferro na presença de isocitrato.....	30
TABELA 3 - Efeito <i>scavenger</i> de H ₂ O ₂ pelos compostos teluroacetilenos a-d e trolox	30

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

FIGURA 1 - Redução do O ₂ a H ₂ O.....	5
FIGURA 2 - Etapas do processo de peroxidação lipídica.....	7
FIGURA 3 - Estrutura química dos compostos teluroacetilenos a-d	14

Capítulo 1

FIGURA 1 - Chemical structure of telluroacetylenes a-d	20
FIGURA 2 - Effect of telluroacetylene b (10 mg/Kg) on TBARS levels in brains of mice treated with SNP.....	23
FIGURA 3 - Effect of telluroacetylene b (10 mg/Kg) on GST activity in brains of mice treated with SNP.....	23
FIGURA 4 - Effect of telluroacetylene b (10 mg/Kg) on GPx activity in brains of mice treated with SNP.....	23
FIGURA 5 - Effect of telluroacetylene b (10 mg/Kg) on δ -ALA-D activity in brains of mice treated with SNP.....	23

LISTA DE ESQUEMAS

Revisão Bibliográfica

ESQUEMA 1 - Reação de Haber-Weiss	5
ESQUEMA 2 - Formação do peroxinitrito a partir do óxido nítrico	6
ESQUEMA 3 - Formação do radical hidroxila a partir do ânion ferricianeto	9
ESQUEMA 4 - Funções das enzimas antioxidantes	10

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS - 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

δ-ALA-D - δ-Aminolevulinato desidratase

CAT - Catalase

DPPH - 1,1-Difenil-2-picril-hidrazil

DTT - Ditioneitol

ERs - Espécies reativas

GSSG - Glutaciona oxidada

GPx - Glutaciona peroxidase

GR - Glutaciona redutase

GSH - Glutaciona reduzida

i.c.v - Intracerebroventricular

CI₅₀ - Concentração que causa 50% de inibição

L[•] - Radical lipídico

LH - Ácido graxo insaturado

LOO[•] - Radical peroxil

LOOH - Hidroperóxido lipídico

MDA - Malondialdeído

Na⁺/K⁺ ATPase - Sódio/potássio ATPase

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

RLs - Radicais livres

SDH - Succinato desidrogenase

-SH - Grupamento tiólico

SNP - Nitroprussiato de sódio

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Estresse oxidativo	4
3.1.1. Radicais livres e espécies reativas	4
3.1.2. Danos celulares causados por espécies reativas	6
3.1.2.1. Peroxidação lipídica	6
3.1.2.2. Oxidação de proteínas	8
3.2. Agentes pró-oxidantes	9
3.2.1. Malonato	9
3.2.2. Nitroprussiato de sódio	9
3.3. Sistema de defesa antioxidante	10
3.4. Telúrio	11
3.4.1. Compostos orgânicos de telúrio	11
3.4.2. Toxicologia dos compostos orgânicos de telúrio	12
3.4.3. Farmacologia dos compostos orgânicos de telúrio.....	13
4. RESULTADOS	16
4.1. Capítulo 1: Artigo Científico: Efeito antioxidante de uma nova classe de compostos teluroacetilenos: estudos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	17
4.2. Capítulo 2: Resultados Complementares	26
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÕES	36
7. PERSPECTIVAS	37
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

O metabolismo celular produz continuamente espécies reativas através da respiração e outras atividades metabólicas (Azbill et al., 1997; Halliwell, 1994). Essas espécies reativas podem ser neutralizadas por defesas antioxidantes (Rodriguez-Martinez et al., 2000; Santamaría et al., 2003). Entretanto, o desequilíbrio entre os sistemas de defesa antioxidante e uma elevada produção de espécies reativas resulta no estresse oxidativo. Esse quadro de estresse oxidativo pode causar danos a todas as estruturas celulares, incluindo DNA, lipídios e proteínas (Halliwell e Gutteridge, 2007; Dawson e Dawson, 1996) o que tem sido associado a uma variedade de doenças como aterosclerose, câncer e doenças neurodegenerativas (Lohr, 1991; Ames et al., 1993; Halliwell, 1994; Witztum, 1994; Alexi et al., 2000; Johnson, 2004). A descoberta de antioxidantes naturais e compostos sintéticos poderia abrir a possibilidade de novas intervenções terapêuticas contra essas doenças (Bixby et al., 2005; Nogueira et al., 2004; Steffen et al., 2005).

Dessa forma, há um considerável interesse no potencial antioxidante dos compostos orgânicos de telúrio contra muitos agentes pró-oxidantes, como peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, radicais hidroxil e ânion radical superóxido (Briviba et al., 1998; Jacob et al., 2000; Ren et al., 2001), já que estes compostos podem mimetizar a atividade da glutathione peroxidase (Andersson et al., 1993). Além disso, compostos orgânicos de telúrio são promissoras drogas antitumorais e seu efeito quimioprotetor pode ser relacionado às suas propriedades citotóxicas, inibindo importantes enzimas necessárias ao crescimento do tumor (Engman et al., 2000; Cunha et al., 2005).

Entretanto, compostos orgânicos de telúrio são descritos como neurotóxicos por causar alterações na memória, desmielinização e neuropatia periférica (Toews et al., 1997; Goodrum, 1998; Landen e Porter, 2001). O ditelureto de difenila, um composto orgânico de telúrio, é tóxico ao sistema glutamatérgico (Nogueira et al., 2002, 2004). O mecanismo dessa toxicidade envolve a oxidação de grupos -SH de moléculas biologicamente ativas (Deuticke et al., 1992). A enzima sulfidrídica delta-aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D), é um dos alvos dos compostos orgânicos de telúrio. Esta enzima possui no seu sítio ativo dois resíduos cisteinil, que são facilmente oxidados *in vitro* e *in vivo* por compostos de telúrio orgânicos, levando a sua inibição (Maciel et al., 2000; Nogueira et al., 2003a). Apesar da toxicidade dos

compostos orgânicos de telúrio, as propriedades farmacológicas relatadas na literatura nos encorajam a avaliar novos compostos, dentre eles, os teluroacetenos.

Além disso, tem sido demonstrado que compostos orgânicos de telúrio apresentam atividade antioxidante em diversos modelos de estresse oxidativo (Briviba et al., 1998; Jacob et al., 2000), principalmente no cérebro (Ávila et al., 2006). O cérebro é mais vulnerável aos efeitos causados pelo estresse oxidativo do que outros tecidos devido ao alto consumo de oxigênio (Sah et al., 2002) e porque possui altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados facilitando o início e a propagação dos processos oxidativos (Seviand e McLeod, 1997).

O nitroprussiato de sódio (SNP) é um composto nitroso inorgânico que tem sido empregado como droga hipotensora por mais de 50 anos (Harrison e Bates, 1993). O SNP ($[\text{NO-Fe}(\text{CN})_5]$), um complexo coordenado de íons Fe^{2+} , cinco ânions cianetos e um cátion NO^+ , é uma substância química que, em meio aquoso intracelular, libera NO^* à longo prazo (Bates et al., 1991). O NO^* , liberado do SNP, pode reagir com radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) formando peroxinitrito (ONOO^-), o qual é um forte agente oxidante envolvido no dano tecidual (Darley-Usmar et al., 1995). Além disso, o SNP também gera o ânion ferricianeto ($[(\text{CN})_5\text{-Fe}]^{-3}$), que pode reagir com o H_2O_2 e, via a reação de Fenton, gerar o radical OH^* (Graf et al., 1984). Assim, o estudo de novos compostos de telúrio, com potencial antioxidante para detoxificar diferentes espécies reativas, pode representar alternativas terapêuticas para controlar o dano oxidativo cerebral.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Tendo em vista o potencial antioxidante de compostos orgânicos de telúrio, este trabalho visa avaliar o efeito antioxidante de uma nova classe de compostos orgânicos de telúrio, os teluroacetilenos, *in vitro* e em um modelo de estresse oxidativo em camundongos *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

Considerando os aspectos já mencionados, os objetivos específicos deste trabalho compreendem:

- Investigar o potencial antioxidante dos compostos teluroacetilenos **a-d** na peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas.

- Verificar o possível efeito mimético dos teluroacetilenos **a-d** na atividade das enzimas glutatona peroxidase (GPx) e glutatona S-transferase (GST) *in vitro*.

- Avaliar o possível papel protetor dos teluroacetilenos **a-d** na auto-oxidação do Fe^{2+} *in vitro*.

- Analisar a atividade dos teluroacetilenos **a-d** como *scavenger* de radicais 2,2'-difetil-1-picrilhidrazila (DPPH^{*}) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺⁺), e como *scavenger* de H_2O_2 *in vitro*.

- Investigar a toxicidade dos compostos teluroacetilenos **a-d** através da atividade da δ -ALA-D *in vitro*

- Estudar, *in vivo*, os efeitos do tratamento oral com teluroacetileno **b** contra o estresse oxidativo induzido por SNP em cérebro de camundongos através de parâmetros bioquímicos, tais como, peroxidação lipídica, atividade da δ -ALA-D e atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutatona redutase (GR), GPx e GST.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Estresse Oxidativo

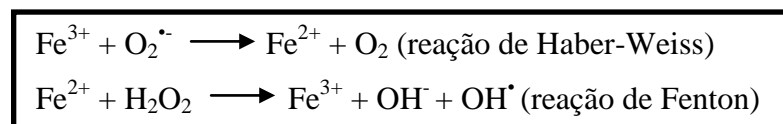
O metabolismo basal das células aeróbicas produz continuamente radicais livres (RLs) e espécies reativas (ERs) através da respiração e outras atividades metabólicas (Azbill et al., 1997; Halliwell, 1994). Esses RLs e ERs podem ser neutralizados por defesas antioxidantes, de forma a manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas (Rodriguez-Martinez et al., 2000; Santamaría et al., 2003). ERs que são produzidas constantemente sob condições normais nas células desempenham funções importantes para o organismo como a coordenação da inflamação e como segundo-mensageiros, por exemplo (Droge, 2002). Entretanto, esses processos, ao se exacerbarem em decorrência de alguma doença, acabam causando a excessiva produção das ERs (Halliwell e Gutteridge, 2003). O desequilíbrio entre os sistemas de defesa antioxidante e uma elevada produção de ERs pode desencadear mudanças fisiológicas, denominadas de estresse oxidativo (Halliwell, 1992; Dawson e Dawson, 1996). O estresse oxidativo está relacionado com o aparecimento de diversas doenças, tais como aterosclerose, câncer e doenças neurodegenerativas (Lohr, 1991; Ames et al., 1993; Halliwell, 1994; Witztum, 1994; Alexi et al., 2000; Johnson, 2004).

3.1.1. Radicais livres e Espécies reativas

Os RLs são moléculas, com existência independente, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, o que os torna instáveis e altamente reativos (Ramos et al., 2000; Halliwell e Gutteridge, 2003). No organismo humano são produzidos não só os RLs, mas as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. As ERs embora não apresentem elétrons desemparelhados podem participar de reações catalisadas por metais de transição, gerando RLs. A geração de RLs pode ocorrer em qualquer compartimento celular, porém a mitocôndria é o principal sítio devido ao alto consumo de oxigênio (Piantadosi e Zhang, 1996).

Na redução incompleta do oxigênio (O_2), quando esse recebe um a dois elétrons, ocorre a geração de superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente, compreendendo juntamente com o radical hidroxil (OH^{\cdot}) as principais espécies reativas de oxigênio (**Figura 1**).

O radical ânion $O_2^{\cdot-}$ apresenta-se no estado de redução de um elétron do O_2 e pode ser formado em reações de auto-oxidação na cadeia transportadora de elétrons (Mandelker, 2008). O $O_2^{\cdot-}$ possui uma menor reatividade se comparado ao radical hidroxil, podendo se difundir a maiores distâncias. Além disso, o $O_2^{\cdot-}$ é capaz de inativar enzimas que possuem um centro ferro-enxofre, causando a liberação do íon ferro. Ferro e $O_2^{\cdot-}$ podem reagir via reação de Haber-Weiss, uma reação em cadeia que inclui a reação de Fenton, gerando o radical hidroxil (OH^{\cdot}) (**Esquema 1**) (Haber e Weiss, 1932). O radical hidroxil é uma espécie altamente reativa. É produzido *in vivo* por diversos processos e, uma vez formado, reage com qualquer biomolécula presente no seu local de formação (Halliwell e Gutteridge, 2003).



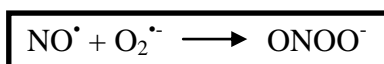
Esquema 1: Reação de Haber-Weiss.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie que pode ser gerada pela dismutação do superóxido e por ação de algumas enzimas, como a xantina oxidase (Halliwell e Gutteridge, 2003). Embora o H_2O_2 não seja considerado um radical por não possuir um elétron desemparelhado, é incluído como uma espécie reativa de oxigênio pelas reações que pode desencadear e os radicais que pode gerar. O H_2O_2 pode degradar algumas hemeoproteínas (mioglobina e hemoglobina, por exemplo), liberando ferro. A reação do H_2O_2 com metais é amplamente conhecida como a reação de Fenton, como anteriormente demonstrada (Halliwell e Gutteridge, 2003).



Figura 1: Redução do O_2 a H_2O .

Dentre as espécies de nitrogênio, as mais danosas são o óxido nítrico (NO^\bullet) e o peroxinitrito (ONOO^-). O NO^\bullet é um gás muito reativo, formado no organismo pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), sendo uma importante molécula sinalizadora e presente em diversas partes do corpo (Halliwell et al., 1999). Por ser um gás o NO^\bullet se difunde facilmente nas membranas celulares, sendo perigoso em excesso, pois ao reagir com o $\text{O}_2^{\bullet-}$, gera o ONOO^- . O ONOO^- é um agente oxidante e nitrante. Suas propriedades oxidantes atuam em diversas biomoléculas, incluindo proteínas e o DNA. É citotóxico em pH 7,4 e a sua adição às células causa morte celular geralmente por apoptose (Halliwell et al., 2003).



Esquema 2: Formação do peroxinitrito a partir do óxido nítrico.

3.1.2 Danos celulares causados por espécies reativas

As ERs são capazes de causar estresse oxidativo em consequência de suas propriedades oxidantes e da reação com os constituintes celulares (Josephy, 1997; Timbrell, 2000). A produção excessiva de ERs provoca muitas consequências negativas, entre elas, causa dano nas biomoléculas alvo, tais como o DNA, lipídios e proteínas (Josephy, 1997; Timbrell, 2000). Com isso, o estresse oxidativo pode estar relacionado com vários processos deletérios, tais como: mutagênese, carcinogênese, peroxidação lipídica, oxidação e fragmentação de proteínas e carboidratos (Sies, 1997).

3.1.2.1. Peroxidação lipídica

Dentre as biomoléculas mais acometidas pelo dano oxidativo mediado por ERs e RLs estão as membranas celulares. As membranas celulares apresentam uma estrutura geral comum que compreende uma bicamada lipídica associada a proteínas. Os componentes lipídicos das membranas são principalmente fosfolipídios, os quais possuem uma cabeça polar e duas caudas hidrofóbicas apolares. As caudas hidrofóbicas são compostas por ácidos graxos, os quais podem apresentar uma ou mais insaturações (Alberts et al., 1994; Halliwell e

Gutteridge, 2003). A peroxidação lipídica ocorre em três estágios: iniciação, propagação e terminação (**Figura 2**).

Na fase de iniciação, o hidrogênio do ácido graxo insaturado (LH) do fosfolípido de membrana é removido por uma ER produzindo o radical lipídico L^{\bullet} . Em seguida, na fase de propagação, o radical lipídico formado na reação anterior reage com o oxigênio molecular (O_2), formando o radical peroxila (LOO^{\bullet}), este radical pode dar início a um novo processo de remoção de hidrogênio de uma nova molécula de ácido graxo gerando mais um radical L^{\bullet} e hidroperóxido ($LOOH$) (Slater, 1984; Halliwell, 1992). Esses radicais peroxilas formados podem facilmente atacar as proteínas de membrana, produzindo maiores danos (Barreiros et al., 2006). Depois, na terminação, dois radicais se combinam e formam um não-radical (Augusto, 2006).

Através de outras reações como, por exemplo, as catalisadas por metais de transição como o cobre e o ferro, o hidroperóxido lipídico pode ser quebrado e formar outros produtos como alcanos, aldeídos e o malondialdeído (MDA), que é marcador químico da peroxidação lipídica. Estudos que visam investigar o envolvimento da peroxidação lipídica podem ser feitos utilizando uma técnica de determinação indireta das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, na qual um dos produtos finais da peroxidação lipídica, o MDA, reage com o ácido tiobarbitúrico, originando um produto de cor rosa que pode ser quantificado espectrofotometricamente (Ohkawa, 1979).

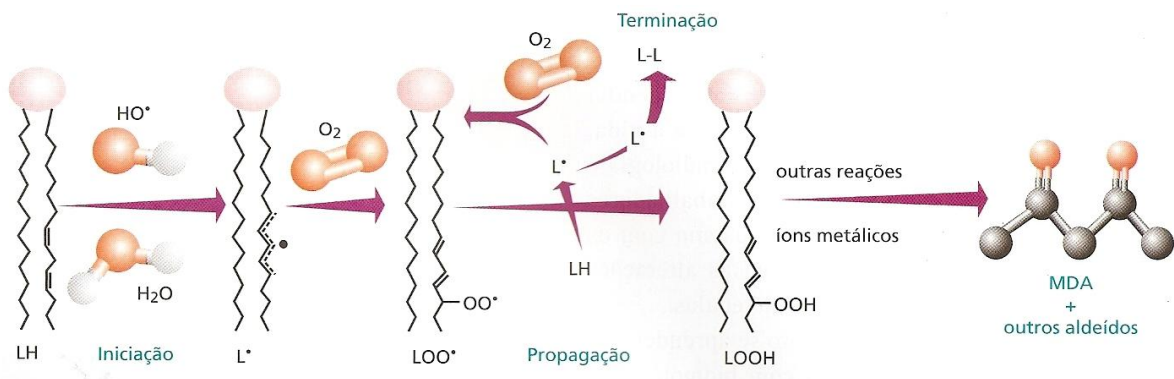


Figura 2: Etapas do processo de peroxidação lipídica.

O comprometimento das membranas decorrentes da peroxidação lipídica determina a perda de suas características arquitetônicas. Nestas condições, as membranas tornam-se suscetíveis a criação de verdadeiras fendas iônicas, o que favorece a entrada e saída

indiscriminada de metabólitos e detritos da célula, favorecendo sua ruptura e lise com consequente necrose celular (Josephy, 1997; Timbrell, 2000).

3.1.2.2. Oxidação de proteínas

As proteínas podem ser diretamente oxidadas por todas as ERs ou também ser alvo dos produtos da peroxidação lipídica. As ERs conduzem à oxidação de resíduos de aminoácidos, o que pode resultar na fragmentação das proteínas (Berlett e Stadtman, 1997). As ERs podem promover o ataque específico aos grupamentos 4Fe-4S, promovendo dessa forma, o aumento da liberação de ferro e inativação da proteína (Halliwell e Gutteridge, 2003). Também pode ocorrer a inativação de enzimas devido à oxidação de grupamentos tióis em resíduos de cisteína presentes nos sítios ativos, levando a formação de ligações dissulfeto (S-S) (Lee et al., 1999).

Outro dano causado às proteínas é a inserção de grupos carbonílicos (CO) nas cadeias laterais de proteínas. Os produtos formados são quimicamente estáveis, podendo ser facilmente estocados e dosados (Dalle-Donne et al., 2003). O H₂O₂ tem a capacidade de provocar a oxidação de alguns resíduos específicos de aminoácidos levando frequentemente à formação dos grupamentos carbonilas nas suas cadeias laterais, como também à quebra da cadeia polipeptídica (Stadtman, 1993; Levine et al., 1994).

A carbonilação de proteínas afeta diretamente o metabolismo celular ao alterar a função das proteínas. Atualmente, a dosagem de proteína carbonilada é o marcador mais utilizado para determinação dos níveis de oxidação protéica. Além disso, o acúmulo de proteínas carboniladas tem sido observado em várias doenças humanas, incluindo mal de Alzheimer, diabetes, doença inflamatória intestinal, hepatite C crônica, artrite reumatóide e outras (Dalle-Donne et al., 2003).

3.2. Agentes pró-oxidantes

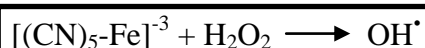
3.2.1. Malonato

O malonato é um inibidor reversível da succinato desidrogenase (SDH), uma enzima chave no metabolismo oxidativo, devido à sua semelhança estrutural com o substrato da enzima, o succinato (Maragos e Silverstain, 1995; Shulz et al., 1996). Sendo assim, seu acúmulo prejudica o metabolismo aeróbio.

O malonato ao inibir a SDH, leva a uma interrupção da fosforilação oxidativa e, por consequência, a uma depleção nos níveis de adenosina trifosfato (ATP). Nessas condições, ocorre uma despolarização pela falência de várias ATPases, principalmente da Na^+/K^+ ATPase (Greene et al., 1993), que mantém a tensão e o gradiente de íons através da membrana plasmática. Ou seja, a inibição da SDH causada pelo malonato leva à disfunção mitocondrial, geração de radicais livres e apoptose (Dedeoglu et al., 2002).

3.2.2 Nitroprussiato de sódio

O nitroprussiato de sódio (SNP) é um composto nitroso inorgânico que tem sido empregado como droga hipotensora por mais de 50 anos (Harrison e Bates, 1993). O SNP ($[\text{NO-Fe}(\text{CN})_5]$), um complexo coordenado de íons Fe^{2+} , cinco ânions cianetos e um cátion NO^+ , é uma substância química que, em meio aquoso intracelular, libera NO^* à longo prazo (Bates et al., 1991). O NO^* , liberado do SNP, pode reagir com radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) formando peroxinitrito (ONOO^-) (**Esquema 2**), o qual é um forte agente oxidante envolvido no dano tecidual (Darley-Usmar et al., 1995). Além disso, o SNP também gera o ânion ferricianeto ($[(\text{CN})_5\text{-Fe}]^{-3}$), que pode reagir com o H_2O_2 e, via reação de Fenton, gerar radicais OH^* (**Esquema 3**) (Graf et al., 1984).

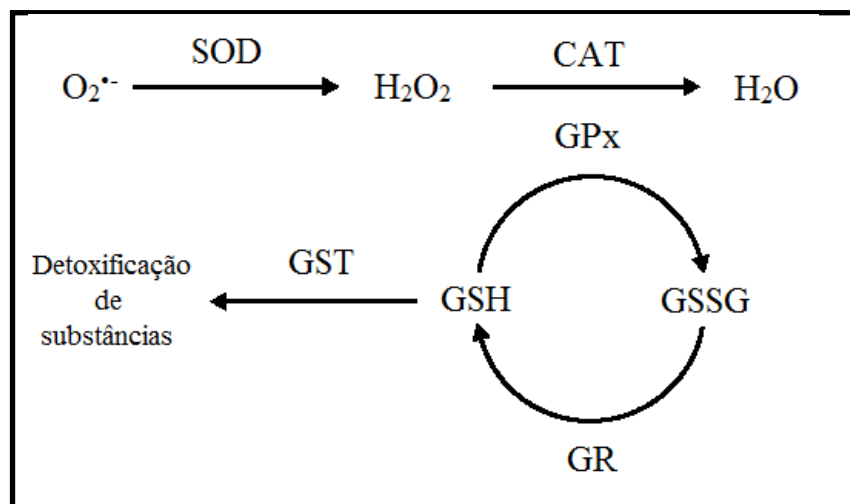


Esquema 3: Formação do radical hidroxila a partir do ânion ferricianeto.

3.3. Sistema de defesa antioxidante

Para evitar a geração de danos oxidativos catalisados por RLs e ERs os organismos aeróbios desenvolveram sistemas de defesas antioxidantes (**Esquema 4**). Antioxidante é qualquer substância que presente em baixa concentração (comparada com uma substância oxidável) retarda ou inibe a velocidade de oxidação do substrato (Sies e Stahl, 1995).

A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima antioxidante que catalisa a reação de dismutação de radical $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 (Marks et al., 1996). O H_2O_2 formado é degradado posteriormente por outras enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPx) (Fridovich, 1975). A CAT é uma hemoproteína que decompõe o H_2O_2 à água (Ferreira e Matsubara, 1997). A GPx, por sua vez, é fundamental no metabolismo de H_2O_2 e de outros peróxidos, pois catalisa reações de doação de elétrons, no qual se utiliza da glutaciona reduzida (GSH) como agente redutor, formando a glutaciona oxidada (GSSG) (Brigelius-Flohe, 1999). A GPx atua acoplada à enzima glutaciona redutase (GR), que catalisa a redução de GSSG. Essa redução requer NADPH como coenzima (Marks et al., 1996). Outra enzima antioxidante que ajuda a combater o estresse oxidativo é a glutaciona S-transferase (GST). A GST atua na detoxificação intracelular (Chasseaund et al., 1979).



Esquema 4: Funções das enzimas antioxidantes.

3.4. Telúrio

O elemento telúrio foi descoberto em 1782. 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 et al., 1997; Zeni et al., 2006). O telúrio pertence ao grupo 16 da tabela periódica, denominada família dos calcogênios. Pode apresentar-se com diferentes estados de oxidação: Te^{+6} (telurato), Te^{+4} (telurito), Te^0 (telúrio elementar) e Te^{+2} (telureto) (Scansetti, 1992). É encontrado com maior frequência na forma de teluretos de ouro, bismuto, chumbo e prata.

O Te^0 é utilizado como componente de ligas metálicas, na composição da borracha, na indústria de microchips e de componentes eletrônicos. Ele também é utilizado na produção industrial de vidro e aço, e como um aditivo antidetonante na gasolina (Fairhill, 1969). Além disso, é empregado no processo de síntese de explosivos, na vulcanização da borracha, em lubrificantes sólidos e na petroquímica (Taylor, 1996). O telúrio inorgânico pode ser encontrado em soluções oxidantes para polir metais (Yarema e Curry, 2005) e na indústria de semicondutores particulados (Green et al., 2007; Zhang e Swihart, 2007).

Em 1967, Schoroeder e colaboradores determinaram, utilizando espectrometria de absorção atômica, que os organismos humanos possuíam aproximadamente 600 mg de telúrio, uma quantidade relativamente grande em comparação com outros elementos-traço como o ferro e o zinco. Apesar desta grande quantidade, nenhuma função fisiológica foi ainda atribuída ao telúrio.

3.4.1. Compostos orgânicos de telúrio

O primeiro composto orgânico de telúrio foi sintetizado por Friedrich Wöhler em 1840 (Wöhler, 1840). Desde sua descoberta até metade do século 20, a química dos compostos orgânicos de telúrio permaneceu obscura e, devido ao pouco interesse dos pesquisadores, às difíceis condições de síntese destes compostos e, especialmente, pelo mau odor que estes exalavam, poucas são as publicações durante este período. Apenas a partir de 1970, os compostos orgânicos de telúrio começaram a ser explorados pelos químicos orgânicos,

refletindo no crescimento exponencial de artigos publicados desde então (Klaman, 1990). Vários destes compostos, com diferentes características e estruturas químicas, vem sendo estudados quanto às suas propriedades fármaco-toxicológicas, sendo alguns deles já descritos na literatura.

3.4.1.1 Toxicologia dos compostos orgânicos de 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. O telúrio pode ser prontamente absorvido pelo organismo, através da dieta, principalmente na forma de compostos orgânicos, mas também ocorre a absorção de telúrio inorgânico na forma de teluritos e teluratos (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 et al., 1989; Taylor, 1996).

A toxicidade dos compostos orgânicos de telúrio deve-se principalmente pela interação com $-SH$ de moléculas biologicamente ativas (Blais et al., 1972; Deuticke et al., 1992). Estes compostos tem a capacidade de oxidar os grupamentos $-SH$, inativando enzimas e/ou diminuindo a concentração de moléculas sulfidrílicas não-protéicas, como a GSH. A oxidação da GSH em GSSG pode ser um dos principais fatores da toxicidade causada pelos compostos orgânicos de telúrio (Barbosa et al., 1998; Nogueira et al., 2003a).

A enzima sulfidrílica δ -ALA-D é um dos alvos dos compostos orgânicos de telúrio mais estudado. Esta enzima possui no seu sítio ativo dois resíduos cisteinil, que são facilmente oxidados *in vitro* e *in vivo* por compostos de telúrio orgânicos, levando a sua inibição (Maciel et al., 2000; Meotti et al., 2003; Nogueira et al., 2003b). Maciel e colaboradores (2000) mostraram a inibição da δ -ALA-D em fígado e cérebro de camundongos após administração aguda e sub crônica de ditelureto de difenila.

Os compostos que contem telúrio são potentes agentes neurotóxicos, uma vez que inibem a atividade da esqualeno monooxigenase, enzima sulfidrílica importante na biossíntese do colesterol que é precursor da mielina (Wagner-Recio et al., 1994; Laden e Porter, 2001). Além disso, a atividade da Na^+/K^+ ATPase, outra enzima sulfidrílica bastante importante para a manutenção da atividade neuronal normal, foi inibida pelo ditelureto de difenila em baixas

concentrações (Borges et al., 2005). Também, o ditelureto de difenila altera o sistema glutamatérgico em ratos adultos e em desenvolvimento, ao diminuir a captação de glutamato em sinaptossomas (Nogueira et al., 2002; Souza et al., 2010).

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

3.4.1.2 Farmacologia dos compostos orgânicos de telúrio

Em 1987, Sredni et al. descreveram pela primeira vez uma atividade farmacológica para um composto orgânico de telúrio, ao demonstrarem as propriedades imunomoduladoras do composto codificado como AS-101 (telurato de tricloro amônio-dioxoetileno-O,O') em camundongos, mediando efeitos antitumorais (Hayun et al., 2006).

A propriedade quimioprotetora dos compostos orgânicos de telúrio, proveniente de seus efeitos citotóxicos, começou a ser explorada por diversos grupos de pesquisa. Engman et al. (2003) sintetizaram uma série de compostos orgânicos de telúrio e observaram que alguns eram bons inibidores da tiorredoxina redutase (TRXr), a qual tem sua expressão gênica aumentada nas células tumorais (Grogan et al., 2000). Dessa forma, estes compostos inibem o crescimento de células cancerosas.

Alquinil vinil teluretos, administrados por via oral, mostraram um efeito do tipo antidepressivo no teste de suspensão da cauda realizado em camundongos, sem alterar a locomoção destes animais (Okoronkwo et al., 2009).

Além destas importantes propriedades, alguns compostos orgânicos de telúrio possuem capacidade de mimetizar a atividade da GPx (Engman et al., 1992; Andersson et al., 1993; Kanda et al., 1999; Ren et al., 2001; You et al., 2003; Braga et al., 2009). Esses compostos orgânicos de telúrio tem sido sugeridos como catalisadores em potencial na redução de peróxidos na presença de tióis (Wirth, 1998; Mishra et al., 2006)

Muitos autores demonstraram o potencial antioxidante de diversos compostos orgânicos de telúrio em ensaios *in vitro* e *ex vivo* (Engman et al., 1995; Wieslander et al., 1998; Engman et al., 2000; Tiano et al., 2000; Kanski et al., 2001; Acker et al., 2009). Gay et al. (2009) mostrou o efeito antioxidante *in vitro* de uma classe de compostos orgânicos de telúrio contra a peroxidação lipídica induzida por ferro e por SNP. Estes compostos inibem a

atividade da δ -ALA-D, entretanto esta inibição ocorre em concentrações maiores às necessárias para que apresentem atividade antioxidante (Gay et al., 2009).

Alguns compostos orgânicos de telúrio foram avaliados em um modelo de dano oxidativo por espécies reativas de nitrogênio (Briviba et al., 1998; Jacob et al., 2000). Nestes estudos, foi demonstrada a capacidade dos compostos de neutralizarem o ONOO⁻ e inibirem a sua capacidade de nitrosilar proteínas.

Estudos *in vitro* mostraram que um telureto vinílico, o dietil-2-fenil-2-telurofenil vinilfosfonato, possui efeito antioxidante contra a peroxidação lipídica induzida por ferro (Ávila et al., 2006). Este composto não apresentou efeitos tóxicos significativos quando administrado sub-agudamente em camundongos pelas vias subcutânea e intraperitoneal (Ávila et al., 2006; 2007). Além disso, este telureto vinílico apresentou atividade antioxidante frente ao agente pró-oxidante SNP e protegeu contra a disfunção mitocondrial induzida por SNP em estruturas cerebrais, indicando possível atividade neuroprotetora *in vitro*, sem alterar o sistema glutamatérgico (Ávila et al., 2008). Outros teluretos vinílicos também apresentaram resultados bastante promissores, uma vez que possuem atividade antioxidante e baixa toxicidade (Savegnago, et al., 2006; Borges et al., 2008).

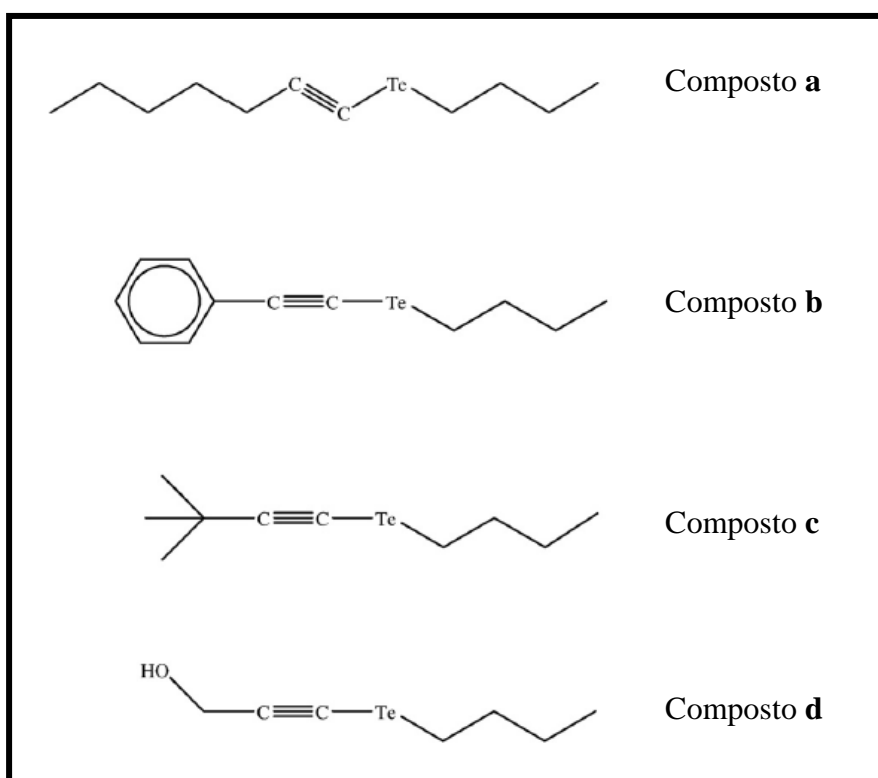


Figura 3: Estrutura química dos compostos teluroacetilenos a-d.

Tendo em vista a ação antioxidante dos compostos orgânicos de telúrio e a relação entre a produção de ERs e diversas doenças, tais como aterosclerose, câncer e doenças neurodegenerativas, torna-se importante a pesquisa de novos agentes antioxidantes. Assim, o estudo *in vitro* e *in vivo* do potencial antioxidante de uma nova classe de compostos orgânicos de telúrio, os teluroacetenos **a-d** (**Figura 3**), pode representar alternativas terapêuticas para controlar o dano oxidativo.

4. RESULTADOS

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados em dois capítulos. Os resultados do Capítulo 1 estão apresentados sob a forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. O artigo está disposto da mesma forma que foi publicado na Revista *Life Sciences*. Os resultados do Capítulo 2 são complementares aos resultados do artigo científico e estão divididos em Materiais e Métodos e Resultados.

CAPÍTULO 1

4.1. Capítulo 1: Artigo Científico

Efeito Antioxidante de Uma Nova Classe de Compostos Teluroacetenos: Estudos *In Vitro* e *In Vivo*

ANTIOXIDANT EFFECT OF A NOVEL CLASS OF TELLUROACETYLENE COMPOUNDS: STUDIES *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Ana Cristina G. Souza, Cristiane Luchese, Jose S. Santos Neto, Cristina W. Nogueira

Life Sciences 84 (2009) 351–357



Contents lists available at ScienceDirect

Life Sciences

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lifescie

Antioxidant effect of a novel class of telluroacetylene compounds: Studies in vitro and in vivo

Ana Cristina G. Souza, Cristiane Luchese, Jose S. Santos Neto, Cristina W. Nogueira *

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 August 2008
Accepted 29 December 2008

Keywords:

Tellurium
Lipid peroxidation
Antioxidant
Brain
Sodium nitroprusside

ABSTRACT

Aims: The effect of telluroacetylenes a–d on pharmacological assays was investigated in vitro. A second objective of this study was to investigate the antioxidant action of compound b against the oxidative damage induced by sodium nitroprusside (SNP) in mouse brain.

Main methods: In in vitro experiments, lipid peroxidation (LP) and protein carbonyl (PC) levels and δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity were carried out in rat brain homogenate. The thiol peroxidase-like activity and DPPH radical scavenging of telluroacetylenes a–d were investigated. In in vivo experiments, mice received SNP (0.335 μ mol per site) intra cerebroventricular (i.c.v.) thirty minutes after oral administration of telluroacetylene b (10 mg/kg). After 1 h, animals were euthanized. The levels of LP and δ -ALA-D, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) activities were carried out in mouse brain homogenate.

Key findings: Telluroacetylenes a–d, at low μ M range, reduced LP and PC levels in rat brain homogenate. Telluroacetylenes a–d showed effect of scavenging DPPH radicals. δ -ALA-D activity was inhibited by telluroacetylenes a–d, at high μ M range, in rat brain homogenate. Brains of mice treated with SNP showed an increase in LP and the reduction in δ -ALA-D, GR and GST activities. Telluroacetylene b protected against the oxidative stress caused by SNP in brain of rats.

Significance: The results support an antioxidant effect of telluroacetylenes a–d in vitro. Telluroacetylene b protected against oxidative damage caused by SNP in mouse brain, suggesting an antioxidant effect of this compound.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Organotellurium compounds have been reported as antioxidants in several models of oxidative stress (Briviba et al., 1998; Jacob et al., 2000), especially in brain (Ávila et al., 2006). Conversely, organotellurium compounds are described as neurotoxic (Goodrum, 1998; Landen and Porter, 2001), being one of them, diphenyl ditelluride, a very toxic compound to glutamatergic system (Nogueira et al., 2001, 2004). The brain is more vulnerable to oxidative stress damaging effects than other tissues due to high consumption of oxygen (Sah et al., 2002). Moreover the brain has high concentrations of polyunsaturated fatty acids in which oxidative processes can be rather easily initiated and once underway the process is self-propagation (Seviand and McLeod, 1997).

There has been a considerable interest in organotellurium compounds as potential antioxidants in living systems against several pro-oxidant agents, such as hydrogen peroxide, peroxynitrite, hydroxyl radicals and superoxide radical anions (Briviba et al., 1998; Jacob et al., 2000; Ren et al., 2001), since these compounds may mimic glutathione peroxidase (GPx) activity (Engman et al., 1994). Besides, tellurides are promising antitumoral drugs and their chemoprotective effects can be

related to their cytotoxic properties and to their ability to inhibit important enzymes necessary for the tumor growth (Engman et al., 2000; Cunha et al., 2005).

Oxygen and nitrogen reactive species react with unsaturated fatty acids in cell membranes promoting a process called lipid peroxidation. This event is present during normal cell metabolism, but is exacerbated in neurodegenerative disorders (Halliwell, 1992). It can induce several impairments on cell function, including alterations on neurotransmitter release and uptake, ion-channel activity, cell surface proteins and mitochondrial function, culminating in cell death (Mattson, 1998).

Sodium nitroprusside (SNP) is an inorganic nitroso compound that has been employed sporadically as a hypotensive drug for over 50 years (Harrison and Bates, 1993). There are several studies concerning the role of nitric oxide (NO) in the pathophysiology of strokes, traumas, seizures, Alzheimer's and Parkinson's diseases (Prast and Philippou, 2001; Weisinger, 2001).

Following our longstanding interest in pharmacological and toxicological properties of organochalcogens, this study investigated the effect of telluroacetylenes a–d on pharmacological assays in vitro. Considering the results obtained in vitro, a second objective of this study was to investigate the antioxidant action of telluroacetylene b against the oxidative stress induced by SNP in brain of mice.

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8140; fax: +55 55 3220 8978.
E-mail address: criswn@quimica.ufsm.br (C.W. Nogueira).

Materials and methods

Chemicals

Glutathione reductase from baker's yeast, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) tetrasodium salt, reduced glutathione (GSH), glutathionedisulfide (GSSG), SNP, malonate and δ -aminolevulinic acid were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was purchased from Aldrich Chemical Co (USA). Telluroacetylenes a–d (Fig. 1) were prepared according to the literature method (Comasseto et al., 1996).

Analysis of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra showed that all telluroacetylenes synthesized exhibited analytical and spectroscopic data in full agreement with their assigned structures. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers. Telluroacetylene solutions were freshly made to carry out the experiments. Therefore, in the reaction conditions used in these experiments telluroacetylenes were stable.

Animals

Male adult albino Wistar rats (200–300 g) and male adult Swiss mice (25–35 g) from our own breeding colony were used. The rats were used for in vitro, while the mice for in vivo experiments. The animals were kept on a separate animal room, in a 12 h light/dark cycle, at a room temperature of 22 ± 2 °C, with free access to food (Guabi, RS, Brazil) and water. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Santa Maria, Brazil.

In vitro experiments

The in vitro experiments were carried out to investigate the antioxidant effect of telluroacetylenes a–d.

Tissue preparation

Rats were euthanized and the brain tissue was rapidly dissected, weighed and placed on ice. The brain tissue was immediately homogenized in cold 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (1/5, w/v). Protein carbonyl was assayed using the homogenate. The homogenate was centrifuged at $2400 \times g$ at 4 °C for 10 min and a low-speed supernatant (S_1) was used for in vitro assays. S_1 was used for lipid peroxidation and δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) assays.

Lipid peroxidation

This assay was carried out to determine if telluroacetylenes a–d protect against lipid peroxidation induced by SNP and malonate in rat brain homogenate in vitro. SNP and malonate were used as classical inducers of lipid peroxidation. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS) were used as a measure of lipid peroxidation. TBARS were determined as described by Ohkawa et al. (1979). An aliquot of 100 μl of S_1 was added to the reaction mixture containing: 50 μM SNP or malonate, telluroacetylenes at different concentrations (0.5–7.5 μM) and 30 μl of 50 mM Tris-HCl, pH 7.4. Afterward the mixture was pre-incubated for 1 h at 37 °C. The reaction product was determined using 500 μl thiobarbituric acid (0.8%), 200 μl 8.1% sodium dodecyl sulphate (SDS), and 500 μl acetic acid (pH 3.4) and incubated at 95 °C for 2 h. The absorbance was measured at 532 nm in spectrophotometer. Results were reported as nmol MDA (malondialdehyde) /mg protein.

Protein carbonyl content

Oxidatively modified proteins contain an enhancement of carbonyl content (Yan et al., 1995). Carbonyl content was assayed by a method based on the reaction of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) forming dinitrophenylhydrazone, a yellow compound, measured spectrophotometrically at 370 nm (Levine et al., 1990). This assay was used to determine if telluroacetylenes a–d protect against the protein carbonylation induced by SNP. Briefly, the brain homogenate was diluted 1:8 (v/v) and incubated 2 h with telluroacetylenes a–d at

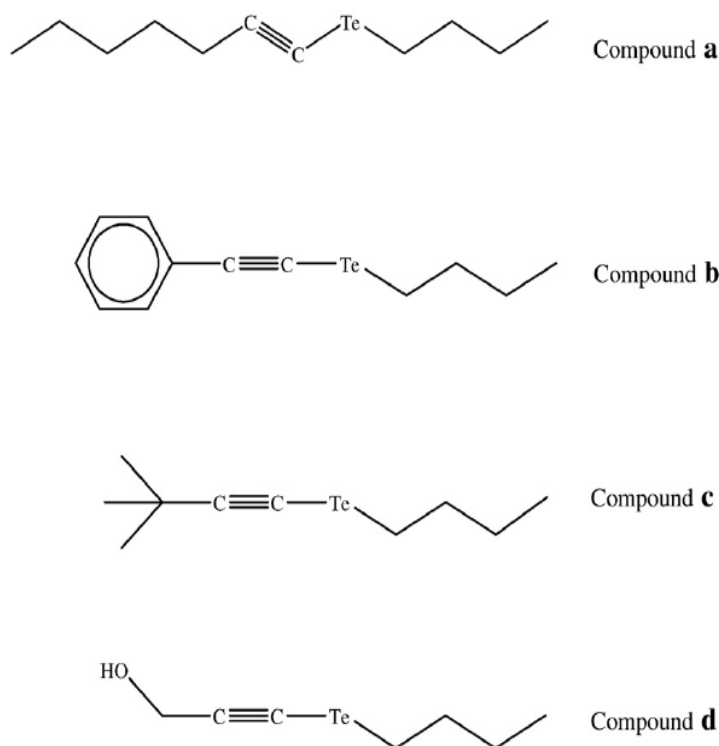


Fig. 1. Chemical structure of telluroacetylenes a–d.

different concentrations (0.1–5.0 μM) and SNP (50 μM). Then, 1 ml of aliquot was mixed with 200 μl 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) or 200 μl 2 M HCl. After incubation at room temperature for 1 h in a dark ambient, 500 μl of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3% SDS), 1.5 ml of heptane (99.5%) and 1.5 ml of ethanol (99.8%) were sequentially added. The tubes were mixed with vortex agitation for 40 s and centrifuged for 15 min. Next, the protein isolated from the interface was washed two times with 1 ml of ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 1 ml of denaturing buffer. Total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Results were reported as carbonyl content (nmol/mg protein).

Thiol peroxidase-like activity

Thiol peroxidase-like activity was carried out to determine the possible mechanism by which telluroacetylenes a–d exhibit anti-oxidant property. Free –SH groups were determined according to Ellman (1959). The catalytic effect of telluroacetylenes a–d on the reduction of H_2O_2 by GSH was assessed using the rate of reduced glutathione (GSH) oxidation. Telluroacetylenes a–d were incubated in the medium containing GSH (1.0 mM) with and without H_2O_2 (0.3 mM). At 120 min, aliquots of the reaction mixture (200 μl) were checked for the amount of GSH. The values are expressed in percentage of control.

Scavenging 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals

The scavenging effect of DPPH radicals was performed to determine the possible mechanism by which telluroacetylenes a–d exhibit antioxidant property. The DPPH stable radical was performed in accordance with Choi et al. (2002). Briefly, 85 μM DPPH was added to a medium containing telluroacetylenes a–d at different concentrations (1–200 μM). The medium was incubated for 30 min at room temperature. The decrease in absorbance was measured at 518 nm, which depicted the scavenging activity of telluroacetylenes against DPPH. Ascorbic acid (1–200 μM) was used as a positive control to determine the maximal decrease in DPPH absorbance. The values are expressed in percentage of inhibition of DPPH absorbance in relation to the control values without telluroacetylenes.

δ -ALA-D activity

δ -ALA-D has been reported as sensitive to pro-oxidants and heavy metals (Rocha et al., 1995; Nogueira et al., 2003a,b). Therefore, δ -ALA-D activity was used as a marker of toxicity. δ -ALA-D activity was assayed by the method of Sassa (1982) with some modifications. The principle of this method is based on the enzyme incubation with an excess of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA). An aliquot of 200 μl of S_1 was pre-incubated for 10 min at 37 °C in the presence or absence of telluroacetylenes a–d at different concentrations (25–400 μM). Enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (δ -ALA) to a final concentration of 2.2 mM in a medium containing 45 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8. The incubation was carried out for 3 h at 37 °C. The incubation was stopped by adding trichloroacetic acid solution (10% TCA) with 10 mM HgCl_2 . The porphobilinogen, which is formed during the incubation period, was mixed with modified Ehrlich's reagent, and the color developed was measured spectrophotometrically (555 nm) against a blank. Results were expressed as nmol porphobilinogen (PBG)/mg protein/h.

Effect of DTT and ZnCl_2 on δ -ALA activity in the presence of telluroacetylenes a–d

Aiming at studying the effect of DTT (3 mM) or ZnCl_2 (100 μM) on inhibition of δ -ALA-D activity, S_1 was pre-incubated at 37 °C for 10 min with telluroacetylenes a–d (IC_{50}). After the pre-incubation time, the reaction was started by the addition of substrate (δ -ALA) and DTT or ZnCl_2 . The incubation was carried out at 37 °C for 3 h. δ -ALA-D activity was assayed as described the steps above.

In vivo experiments

Considering that in vitro results were very similar, telluroacetylene b was used to investigate its antioxidant property against oxidative damage induced by SNP in the brain of mice.

Protocol of exposure

Mice were divided into four groups of eight animals each. Mice belonging to groups II and IV received oral administration of telluroacetylene b (10 mg/kg). Animals of groups I and III received oral application of canola oil (10 ml/kg of body weight). Thirty minutes after the treatment, mice of groups III and IV received SNP (0.335 μmol per site) intra cerebroventricular (i.c.v.). Groups I and II received saline solution (i.c.v.). The dosage of SNP was based on previous study (Prigol et al., 2008). I.c.v. injections were given as described by Haley and McCormick (1957) and modified by Laursen and Belknap (1986), with the bregma fissure as a reference point.

Tissue preparation

One hour after SNP or saline administration all mice were euthanized and the brains of animals were removed and homogenized as described the steps above. The low-speed supernatants (S_1) were separated and used for in vivo assays.

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was carried out with an aliquot of S_1 (200 μl) as described above section, excepting for the absence of the pre-incubation step.

Catalase activity

CAT activity was assayed spectrophotometrically by the method of Aebi (1984), which involves monitoring the disappearance of H_2O_2 in the homogenate at 240 nm. Enzymatic reaction was initiated by adding an aliquot of 20 μl of S_1 and the substrate (H_2O_2) to a concentration of 0.3 mM in a medium containing 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. The enzymatic activity was expressed in U/mg protein. One unit will decompose 1 μmol of H_2O_2 per min at pH 7 at 25 °C.

Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm by the method of Habig et al. (1974). The reaction mixture contained an aliquot of S_1 , 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, 100 mM GSH and 100 mM CDNB, which was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as nmol CDNB conjugated/min/mg protein.

Glutathione reductase (GR) activity

GR activity in S_1 was determined as described by Calberg and Mannervik (1985). In this assay, GSSG is reduced by GR at the expense

Table 1
Effect of telluroacetylene compounds a–d on TBARS levels induced by malonate in rat brain homogenate

	Telluroacetylene (μM)			
	a	b	c	d
Control	113 \pm 12 [#]	104 \pm 18 [#]	101 \pm 13 [#]	99 \pm 17 [#]
Induced	212 \pm 22*	238 \pm 22*	215 \pm 12*	234 \pm 26*
0.5	151 \pm 10 ^{*,#}	216 \pm 43*	187 \pm 21*	–
1.0	87 \pm 19 ^{*,#}	122 \pm 33 [#]	146 \pm 32 ^{*,#}	220 \pm 30*
1.5	39 \pm 8 ^{*,#}	111 \pm 33 [#]	121 \pm 25 [#]	–
2.0	31 \pm 3 ^{*,#}	35 \pm 8 ^{*,#}	95 \pm 26 [#]	246 \pm 23*
3.0	–	–	57 \pm 4 ^{*,#}	198 \pm 14 ^{*,#}
4.0	–	–	–	90 \pm 19 [#]
5.0	29 \pm 3 ^{*,#}	–	–	106 \pm 20 [#]
7.5	–	–	–	42 \pm 5 ^{*,#}

Data are reported as mean \pm SD of four independent experiments. Results were reported as nmol MDA (malondialdehyde)/mg protein. (*) Denotes $p < 0.05$ as compared to the respective control samples (one-way ANOVA/Duncan). (#) Denotes $p < 0.05$ as compared to the respective induced samples (one-way ANOVA/Duncan).

Table 2
Effect of telluroacetylene compounds a–d on TBARS levels induced by SNP in rat brain homogenate

	Telluroacetylene (μM)			
	a	b	c	d
Control	118 \pm 16 [#]	111 \pm 22 [#]	98 \pm 18 [#]	98 \pm 9 [#]
Induced	452 \pm 47*	501 \pm 36*	439 \pm 48*	419 \pm 60*
0.5	437 \pm 42*	477 \pm 35*	401 \pm 35*	–
1.0	305 \pm 32* [#]	434 \pm 29* [#]	355 \pm 16* [#]	426 \pm 60*
1.5	76 \pm 22 [#]	236 \pm 48* [#]	347 \pm 24* [#]	–
2.0	34 \pm 1* [#]	96 \pm 18 [#]	256 \pm 28* [#]	445 \pm 57*
3.0	–	–	90 \pm 68 [#]	391 \pm 47*
4.0	–	–	–	302 \pm 65* [#]
5.0	32 \pm 18* [#]	–	–	227 \pm 98* [#]
7.5	–	–	–	53 \pm 15 [#]

Data are reported as mean \pm SD of four independent experiments. Results were reported as nmol MDA (malondialdehyde)/mg protein. (*) Denotes $p < 0.05$ as compared to the respective control samples (one-way ANOVA/Duncan). (#) Denotes $p < 0.05$ as compared to the respective induced samples (one-way ANOVA/Duncan).

of NADPH consumption, which was followed at 340 nm. GR activity is proportional to NADPH decay. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

Glutathione peroxidase (GPx) activity

GPx activity in S_1 was assayed spectrophotometrically by the method of Wendel (1981), through the GSH/NADPH/glutathione reductase system, by the dismutation of H_2O_2 at 340 nm. S_1 was added in GSH/NADPH/glutathione reductase system and the enzymatic reaction was initiated by adding H_2O_2 . In this assay, the enzyme activity was indirectly measured by means of NADPH decay. H_2O_2 is reduced and generates GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by glutathione reductase present in the assay media at the expenses of NADPH. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

δ -ALA-D activity

δ -ALA-D activity was assayed as described above, except for the pre-incubation step with telluroacetylenes a–d.

Protein quantification

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

Statistical analysis

The results are presented as mean \pm SD. For in vitro experiments, the data were performed using one-way analysis of variance followed by the Duncan's multiple range test when appropriate. The IC_{50} values were calculated by the probit method using computer software SAS/STAT. Maximal inhibition (I_{max}) values were calculated at the most effective dose used. For in vivo experiments, data were analysed using

Table 3
Effect of telluroacetylene compounds a–d on protein carbonyl content induced by SNP in rat brain homogenate

	Telluroacetylene (μM)			
	a	b	c	d
Control	3.2 \pm 0.4 [#]	3.8 \pm 0.5 [#]	4.5 \pm 0.7 [#]	2.4 \pm 0.3 [#]
Induced	5.5 \pm 0.6*	6.4 \pm 0.3*	6.4 \pm 0.4*	6.2 \pm 1.4*
0.1	4.3 \pm 0.5* [#]	5.6 \pm 0.4* [#]	5.5 \pm 0.4* [#]	5.2 \pm 0.8*
1.0	3.8 \pm 0.5* [#]	5.3 \pm 0.2* [#]	4.8 \pm 0.5 [#]	4.4 \pm 0.6* [#]
2.5	2.6 \pm 0.3 [#]	3.9 \pm 0.5 [#]	3.3 \pm 0.5* [#]	1.8 \pm 0.9 [#]
5.0	2.2 \pm 0.5* [#]	2.6 \pm 0.3* [#]	2.9 \pm 0.1* [#]	1.6 \pm 0.3 [#]

Data are reported as mean \pm SD of four independent experiments. Results were reported as nmol carbonyl content/mg protein. (*) Denotes $p < 0.05$ as compared to the respective control samples (one-way ANOVA/Duncan). (#) Denotes $p < 0.05$ as compared to the respective induced samples (one-way ANOVA/Duncan).

Table 4
Scavenging effect of telluroacetylene compounds (a–d) on DPPH radicals

	Ascorbic acid μM	Telluroacetylene μM			
		a	b	c	d
1	–	99 \pm 1	100 \pm 4	99 \pm 1	97 \pm 7
10	99 \pm 3	83 \pm 4*	89 \pm 8*	89 \pm 4*	89 \pm 5*
50	57 \pm 9*	60 \pm 5*	75 \pm 3*	67 \pm 4*	78 \pm 4*
100	51 \pm 5*	51 \pm 12*	50 \pm 7*	61 \pm 10*	75 \pm 4*
200	49 \pm 3*	49 \pm 6*	40 \pm 14*	50 \pm 6*	71 \pm 5*

Data are reported as mean \pm SD of four independent experiments. The values are expressed in percentage of inhibition of DPPH absorbance in relation to the control value (100%). The control is a tube without telluroacetylene compounds (absorbance around 0.630). (*) Denotes $p < 0.05$ as compared to the respective control samples (one-way ANOVA/Duncan).

two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test when appropriate. P values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered as indicative of significance.

Results

In vitro experiments

Effect of telluroacetylenes a–d on lipid peroxidation induced by malonate or SNP

Telluroacetylenes a, b, c and d were effective in protecting against lipid peroxidation induced by malonate at concentrations equal or greater than 0.5, 1.0, 1.0 and 3.0 μM , respectively (Table 1). The IC_{50} values were 0.93, 1.13, 1.92 and 4.88 μM , respectively. The I_{max} of compounds are 86%, 73%, 85% and 82% for compound a, b, c and d respectively.

Telluroacetylenes a, b, c significantly reduced lipid peroxidation induced by SNP at concentrations equal or greater than 1.0 μM , while telluroacetylene d was effective at concentrations equal or higher than 4.0 μM (Table 2). The IC_{50} values were 1.20, 1.52, 2.67 and 5.80 μM , respectively. The I_{max} values are 93%, 81%, 81% and 87% for compounds a–d respectively.

Effect of telluroacetylenes a–d on protein carbonyl content

Telluroacetylenes a, b and c were effective in reducing protein carbonyl content at concentrations equal or greater than 0.1 μM . Telluroacetylene d significantly reduced protein carbonyl content at concentrations equal or higher than 1 μM (Table 3). The IC_{50} values were 3.17, 4.09, 3.99 and 2.64 μM , respectively. The I_{max} of telluroacetylenes a, b and c was around 50%, while of compound d was 75%.

Effect of telluroacetylenes a–d on thiol peroxidase-like activity

Compounds a–d did not exhibit thiol peroxidase-like activity (data not shown).

Effect of telluroacetylenes a–d on DPPH radical scavenging activity

Telluroacetylenes a–d showed a significant DPPH radical scavenging activity at concentrations equal or higher than 10 μM . The DPPH

Table 5
Effect of telluroacetylene compounds a–d on δ -ALA-D activity in rat brain homogenate

	Telluroacetylene μM			
	a	b	c	d
Control	0.87 \pm 0.11	1.05 \pm 0.18	0.99 \pm 0.14	0.89 \pm 0.07
25	0.74 \pm 0.03	–	0.86 \pm 0.09	0.82 \pm 0.07
50	0.70 \pm 0.11*	0.90 \pm 0.26	0.84 \pm 0.17	0.73 \pm 0.08*
100	0.42 \pm 0.10*	0.59 \pm 0.16*	0.69 \pm 0.11*	0.60 \pm 0.14*
200	0.40 \pm 0.15*	0.41 \pm 0.15*	0.25 \pm 0.05*	0.20 \pm 0.09*
300	0.38 \pm 0.16*	0.32 \pm 0.08*	0.29 \pm 0.04*	0.11 \pm 0.04*
400	0.32 \pm 0.10*	0.34 \pm 0.11*	0.23 \pm 0.06*	0.11 \pm 0.03*

Data are reported as mean \pm SD of four independent experiments. Results were expressed as nmol porphobilinogen (PBG)/mg protein/h. (*) Denotes $p < 0.05$ as compared to the respective control samples (one-way ANOVA/Duncan).

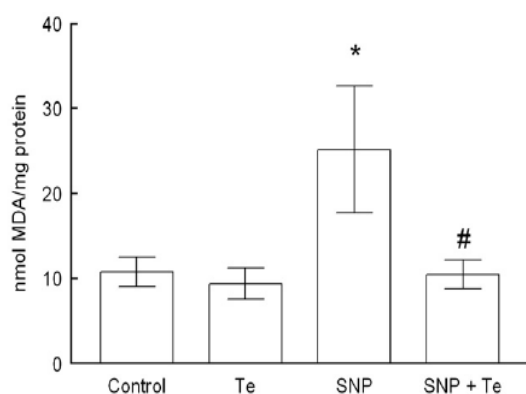


Fig. 2. Effect of telluroacetylene b (10 mg/Kg) on TBARS levels in brains of mice treated with SNP. Data are reported as mean±SD of seven animals per group. (*) Denoted $p < 0.05$ as compared to the control group (two-way ANOVA/Duncan). (#) Denoted $p < 0.05$ as compared to the SNP group (two-way ANOVA/Duncan).

radical scavenging activity of telluroacetylenes appeared as superior (b), similar (a and c) and inferior (d) than that of ascorbic acid (Table 4).

Effect of telluroacetylenes a–d on δ -ALA-D activity

Telluroacetylenes a and d inhibited δ -ALA-D activity at concentrations equal or greater than 50 μ M, while compounds b and c were inhibitors at concentrations equal or greater than 100 μ M (Table 5). The IC_{50} values were 171.16, 177.43, 204.42 and 213.84 μ M, respectively. The I_{max} of compounds a–d was 63%, 68%, 77% and 88%, respectively.

Effect of DTT and $ZnCl_2$ on δ -ALA activity in the presence of telluroacetylenes a–d

DTT was able to restore the inhibition of δ -ALA-D activity caused by telluroacetylenes a–d to the levels of control. $ZnCl_2$ did not restore the inhibitory effect of telluroacetylenes on δ -ALA-D activity (data not shown).

In vivo experiments

Lipid peroxidation

Two-way ANOVA of TBARS levels demonstrated a significant SNP x telluroacetylene b interaction ($F_{1,48} = 29.221$, $P < 0.05$). Post-hoc comparisons showed that SNP increased TBARS levels in brains of mice (2.3 times higher than the control group). Telluroacetylene b protected against the increase in TBARS levels induced by SNP in brains of mice (Fig. 2).

CAT activity

Two-way ANOVA of CAT activity revealed that SNP did not alter the enzyme activity in mice brains (data not shown).

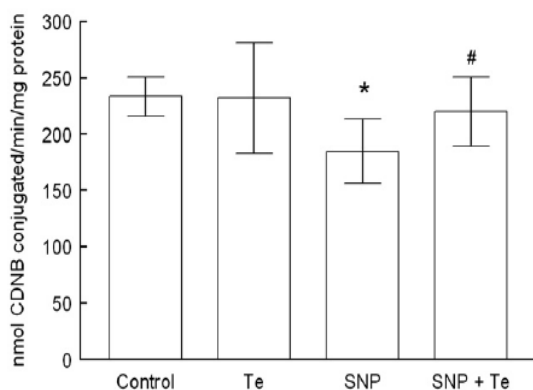


Fig. 3. Effect of telluroacetylene b (10 mg/Kg) on GST activity in brains of mice treated with SNP. Data are reported as mean±SD of seven animals per group. (*) Denoted $p < 0.05$ as compared to the control group (two-way ANOVA/Duncan). (#) Denoted $p < 0.05$ as compared to the SNP group (two-way ANOVA/Duncan).

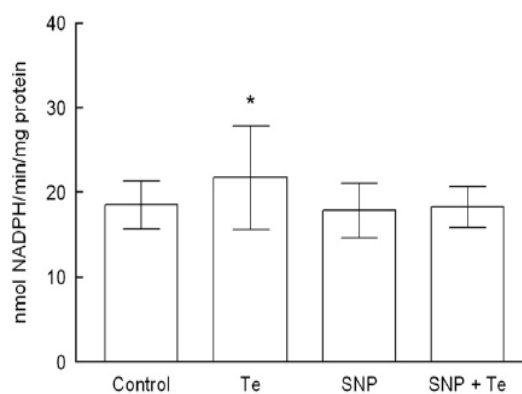


Fig. 4. Effect of telluroacetylene b (10 mg/Kg) on GPx activity in brains of mice treated with SNP. Data are reported as mean±SD of seven animals per group. (*) Denoted $p < 0.05$ as compared to the control group (two-way ANOVA/Duncan).

GST activity

Two-way ANOVA of GST activity demonstrated a significant main effect of telluroacetylene b ($F_{1,40} = 10.020$, $P < 0.05$). Post-hoc comparisons showed that SNP significantly reduced GST activity (21%) of mice brains. Telluroacetylene b protected against the inhibition of enzyme activity caused by SNP in brains of mice (Fig. 3).

GR activity

Two-way ANOVA of GR activity did not yield a significant SNP x telluroacetylene b interaction. Two-way ANOVA of GR activity demonstrated a significant effect of telluroacetylene b ($F_{1,29} = 4.455$, $P < 0.05$). Telluroacetylene b did not protect against the inhibition of GR activity caused by SNP in brains of mice (data not shown).

GPx activity

Two-way ANOVA of GPx activity did not reveal a significant SNP x telluroacetylene b interaction. Two-way ANOVA of GPx activity revealed the effect of telluroacetylene b ($F_{1,54} = 4.770$, $P < 0.05$). Telluroacetylene b increased GPx activity (Fig. 4), while SNP did not change the enzyme activity in brains of mice.

δ -ALA-D activity

Two-way ANOVA of δ -ALA-D activity yielded a significant SNP x telluroacetylene b interaction ($F_{1,59} = 14.411$, $P < 0.05$). Post-hoc comparisons demonstrated that SNP significantly reduced δ -ALA-D activity (25%) in brains of mice. Telluroacetylene b protected against the enzyme inhibition caused by SNP in brains of mice (Fig. 5).

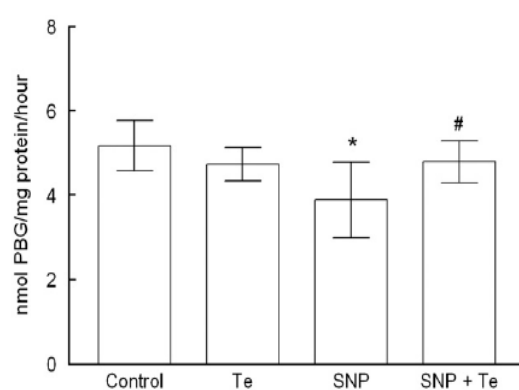


Fig. 5. Effect of telluroacetylene b (10 mg/Kg) on δ -ALA-D activity in brains of mice treated with SNP. Data are reported as mean±SD of seven animals per group. (*) Denoted $p < 0.05$ as compared to the control group (two-way ANOVA/Duncan). (#) Denoted $p < 0.05$ as compared to the SNP group (two-way ANOVA/Duncan).

Discussion

The current study demonstrated that telluroacetylenes a–d exhibited an antioxidant activity at low concentrations (μM range) in rat brain homogenate *in vitro*. Furthermore, telluroacetylene b protected against alterations in TBARS levels and GST activity caused by SNP in mouse brain, confirming the antioxidant potential of this compound.

Tellurium compounds are effective antioxidant agents, even more active than their selenium and sulfur analogues (Engman et al., 2000). In the present study, we demonstrated that telluroacetylenes a–d, at low concentrations, protected against lipid peroxidation induced by malonate or SNP in rat brain homogenate, different from other classical antioxidants such as vitamins C and E, that exhibit antioxidant effect at high concentrations (Reddy et al., 2007; Gehin et al., 2005). The data obtained in this study are similar to those reported in the literature, in which tellurides exhibit antioxidant activity *in vivo* (Ávila et al., 2006; Savegnago et al., 2006). The IC_{50} values of compounds a–d for lipid peroxidation induced by malonate or SNP followed the order: $a=b < c < d$. Therefore, we assume that the antioxidant effect of telluroacetylenes did not depend on the chemical (malonate or SNP) used for the induction of lipid peroxidation. Although all tested telluroacetylenes showed antioxidant activity, one can speculate that the lowest efficiency of compound d against lipid peroxidation is related to its chemical structure. Thus, the presence of the hydroxyl group in the chemical structure of compound d impaired its antioxidant effect on TBARS assay. In this way, there has been reported that the antioxidant effect of organochalcogens is related to their chemical structures (Meotti et al., 2004; Prigol et al., 2008). In contrast, the chemical structures of telluroacetylenes did not alter their antioxidant effects on protein carbonylation.

On the one hand, the antioxidant effect of telluroacetylenes a–d on rat brain homogenate might not be explained by GPx-like activity. Even though GPx-like activity has been reported as the major mechanism by which organochalcogen compounds exert antioxidant activity (Meotti et al., 2004; Nogueira et al., 2004). On the other hand, the DPPH radical scavenging property is probably involved in the mechanism by which telluroacetylenes a–d display antioxidant activity. In fact, our data revealed that the radical-scavenging ability of telluroacetylenes was similar to that of ascorbic acid.

The present investigation indicates that telluroacetylenes a–d, at high μM range, inhibited δ -ALA-D activity in rat brain homogenate. Previous data have reported that organotellurium compounds inhibit sulfhydryl enzymes (Landen and Porter, 2001; Borges et al., 2005) among them δ -ALA-D (Maciel et al., 2000; Nogueira et al., 2001, 2003a,b). The mammalian δ -ALA-D is a metalloenzyme that requires zinc ions for maximal catalytic activity (Jaffe, 2000). Thus, telluroacetylenes could cause a zinc displacement or oxidation of enzyme sulfhydryl groups. In the current study, ZnCl_2 was not able in restoring inhibition of enzyme activity caused by telluroacetylenes a–d in rat brain homogenate, whereas DTT was restored δ -ALA-D activity. Therefore, we can propose that the mechanism involved in δ -ALA-D inhibition caused by telluroacetylenes a–d is related to their ability to oxidize sulfhydryl groups, but not by displacing zinc, from the enzyme structure.

Given that telluroacetylenes a–d were potential antioxidant agents *in vitro*, telluroacetylene b was investigated against oxidative damage induced by SNP in mice brains. Although the stability of tellurium compounds *in vitro* is not related to the breakdown of these compounds in a biological active system, the results obtained *in vitro* may predict the pharmacological potential of compounds *in vivo* (Savegnago et al., 2006; Prigol et al., 2008). The brain is extremely vulnerable to oxidative stress, in part because it is highly enriched with non-heme iron, which is catalytically involved in the production of oxygen free radicals. In addition, the brain contains a relatively high degree of polyunsaturated fatty acids that are particularly good substrates for peroxidation reactions (Halliwell and Gutteridge, 2007).

SNP is a good chemical inducer of lipid peroxidation in brain tissue (Rauhala et al., 1998), as a donor of nitric oxide (NO). In the current

study we demonstrated an increase of lipid peroxidation in mice brains after SNP administration. Such an increase in the levels of TBARS may be due to the depletion of antioxidant scavenger systems caused the increase of susceptibility of brain tissues to lipid peroxidation.

Mice treated with SNP exhibited inhibition of GR activity, an important enzyme for maintenance of intracellular concentration of GSH (Halliwell and Gutteridge, 2007). Our results are in accordance with previous observation (Sahoo et al., 2006) confirming the reduction of GR activity by SNP. Another interesting finding of the present study is the inhibition of GST activity in mice brains treated with SNP. GST also known as phase II enzymes, are widely distributed catalyzing and binding proteins which promote the conjugation of GSH with a variety of reactive electrophilic compounds resulting to formation of substances which are easily excreted from the body (Cervello et al., 1992). Several authors have reported that GST is an antioxidant defense and serves to protect the tissues from oxidative stress (Fiander and Schneider, 1999; Luchese et al., 2008). Moreover, the inhibition of GR and GST activities caused by SNP may be associated with an increase of lipid peroxidation.

The inhibition of δ -ALA-D activity by SNP could be related to the increase in brain oxidative damage, an increase in lipid peroxidation and a decrease in antioxidant defenses. Accumulating evidence have indicated that δ -ALA-D is an enzyme extremely sensitive to situations associated with oxidative stress in different tissues of rodents (Maciel et al., 2000; Jacques-Silva et al., 2001; Meotti et al., 2003; Folmer et al., 2004; Nogueira et al., 2004; Luchese et al., 2007).

The results of the current study also demonstrate that SNP did not change CAT and GPx activities in brains of mice, these data are in accordance with those reported in the literature (Yerer and Aydogan, 2004; Posser et al., 2006; Prigol et al., 2008). Therefore, it is possible that CAT and GPx may regulate the impact of SNP on the cell.

Telluroacetylene b ameliorated TBARS levels, δ -ALA-D and GST activities altered by SNP administration, demonstrating the role of this telluroacetylene against oxidative stress in brains of mice. These data corroborate previous findings showing a potent antioxidant activity of vinylic tellurides in mice (Ávila et al., 2007). The depletion in the GST activity may result in the occurrence of deleterious oxidative changes due to the accumulation of toxic products. In the present study there was significant reduction in the activity of GST in SNP-treated mice brains, and its reduction was recovered to near normal values when treated with telluroacetylene b. Therefore, the decrease of lipid peroxidation could be associated with the increased activities of antioxidant enzymes.

Moreover, telluroacetylene b increased GPx activity in brain of mice. Tellurium compounds could stimulate the expression/de novo synthesis of GPx. Garberg and collaborators (1999) have demonstrated that tellurium could displace selenium of selenoproteins, such as GPx, altering the enzyme activity. This could occur due to post-translational modification and not by substitution of selenium in protein biosynthesis. Alternatively, it is possible that the apparent increase in GPx activity is not really an increase in this enzyme activity after all, but due to a separate, additional catalytic species, such as the tellurium agents themselves or their metabolic products. It is possible that the increase of GPx activity by telluroacetylene b may be involved in the mechanisms by which this compound displays antioxidant activity. GPx is an antioxidant selenoenzyme that reduces variable hydroperoxides at the expense of glutathione and/or other reducing equivalents (Brigelius-Flohe, 1999).

Conclusion

In conclusion, the results of the present investigation support an antioxidant effect of telluroacetylenes a–d on rat brain homogenate *in vitro*. Telluroacetylene b administered to mice protected against oxidative damage caused by SNP in mouse brain, suggesting an antioxidant effect of this compound. The potential beneficial activity of telluroacetylene b against deleterious oxidations was demonstrated in an *in vivo* model of oxidative stress.

Acknowledgements

The financial support by UFSM, FAPERGS, CAPES (Edital Pró-equipamentos/ 2007) and CNPq is gratefully acknowledged. C.W.N. is recipient of CNPq fellowship.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121–126.
- Ávila, D.S., Beque, M.C., Folmer, V., Braga, A.L., Zeni, G., Nogueira, C.W., Soares, F.A.A., Rocha, J.B.T., 2006. Diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate: an organotellurium compound with low toxicity. *Toxicology* 224, 100–107.
- Ávila, D.S., Gubert, P., Dalla Corte, C.L., Alves, D., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., Soares, F.A.A., 2007. A biochemical and toxicological study with diethyl-2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate in a sub-chronic intraperitoneal treatment in mice. *Life Sciences* 80, 1865–1872.
- Borges, V.C., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen on cerebral Na⁺ K⁺-ATPase activity in rats. *Toxicology* 215, 191–197.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Brigelius-Flohe, R., 1999. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 951–965.
- Briviba, K., Tamler, R., Klotz, L.O., Engman, L., Cotgreave, I.A., Sies, H., 1998. Protection against organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. *Biochemical Pharmacology* 55, 817–823.
- Calberg, I., Mannervik, B., 1985. Glutathione reductase. *Methods in Enzymology* 113, 484–490.
- Cervello, I., Lafuente, A., Giral, M., Mallol, J., 1992. Enhanced glutathione S-transferase (GST) activity in pregnant rats treated with benzo(a)pyrene. *Placenta* 13, 273–280.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Science* 153, 1161–1168.
- Comasseto, J.V., Menezes, P.H., Stefani, H.A., Zeni, G., Braga, A.L., 1996. Addition of hydrogen halides to acetylenic selenides. Synthesis of 1-halo-1-selenoalkenes. *Tetrahedron* 52, 9687–9702.
- Cunha, L.O.R., Urano, M.E., Chagas, J.R., Almeida, P.C., Bincoletto, C., Tersariol, I.L.S., Comasseto, J.V., 2005. Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium (IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15, 755–760.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70–77.
- Engman, L., Stern, D., Pelzman, M., 1994. Thiol peroxidase-activity of diorganyl tellurides. *The Journal of Organic Chemistry* 59, 1973–1979.
- Engman, L., Kanda, T., Gallegos, A., Williams, R., Powis, G., 2000. Water soluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. *Anti-Cancer Drug* 15, 323–330.
- Fiander, H., Schneider, H., 1999. Compounds that induce isoforms of glutathione S-transferase with properties of a critical enzyme in defense against oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 262, 591–595.
- Folmer, V., Santos, F.W., Savegnago, L., Britto, V.B., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2004. High sucrose consumption potentiates the sub-acute cadmium effect on Na⁺/K⁺-ATPase but not on delta-aminolevulinic acid dehydratase in mice. *Toxicology Letters* 153, 333–341.
- Garberg, P., Engman, L., Tolmachev, V., Lundqvist, H., Gerdes, R.G., Cotgreave, I.A., 1999. Binding of tellurium to hepatocellular selenoproteins during incubation with inorganic tellurite: consequences for the activity of selenium-dependent glutathione peroxidase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31, 291–301.
- Gehin, A., Guillaume, Y.C., Millet, J., Guyon, C., Nicod, L., 2005. Vitamins C and E reverse effect of herbicide-induced toxicity on human epidermal cells HaCaT: a biochemometric approach. *International Journal of Pharmaceutics* 288, 219–226.
- Goodrum, J.F., 1998. Role of organotellurium species in tellurium neuropathy. *Neurochemical Research* 10, 1313–1319.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249, 7130–7139.
- Haley, T.J., McCormick, W.G., 1957. Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse. *British Journal of Pharmacology* 12, 12.
- Halliwel, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *Journal of Neurochemistry* 59, 1609–1623.
- Halliwel, B., Gutteridge J.M.C. *Free radicals in Biology and medicine*, fourth ed. Clarendon Press, Oxford Science Publications, Oxford/UK, 2007.
- Harrison, D.G., Bates, J.N., 1993. The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. *Circulation* 87, 1461–1467.
- Jacob, C., Arteel, G.E., Kanda, T., Engman, L., Sies, H., 2000. Water soluble organotellurium compounds: catalytic protection against peroxynitrite and release of zinc from metallothionein. *Chemical Research in Toxicology* 13, 3–9.
- Jaffe, E.K., 2000. The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. *Acta Crystallographica Section D* 56, 115–128.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Rocha, J.B.T., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice. *Pharmacology & Toxicology* 88, 119–125.
- Landen, B.P., Porter, T.D., 2001. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. *Journal of Lipid Research* 42, 235–240.
- Laursen, S.E., Belknap, J.K., 1986. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *Journal of Pharmacological Methods* 16, 355.
- Levine, L.R., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186, 464–478.
- Luchese, C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Santos, F.W., 2007. Cadmium inhibits delta-aminolevulinic acid dehydratase from rat lung in vitro: interaction with chelating and antioxidant agents. *Chemico-Biological Interactions* 165, 127–137.
- Luchese, C., Stangherlin, E.C., Gay, B.M., Nogueira, C.W., 2008. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: involvement of glutathione. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.06.003.
- Maciél, E.N., Bolzan, R.C., Braga, A.L., Rocha, J.B.T., 2000. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect delta aminolevulinic acid dehydratase from liver, kidney and brain of mice. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 14, 310–319.
- Mattson, M.P., 1998. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. *Trends in Neurosciences* 21, 53–57.
- Meotti, F.C., Silva, D.O., Santos, A.R.S., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2003. Thophenes and furans derivatives: a new class of potential pharmacological agents. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37, 37–44.
- Meotti, F.C., Stangherlin, E.C., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environmental Research* 94, 276–282.
- 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 Research* 906, 157–163.
- Nogueira, C.W., Soares, F.A., Nascimento, P.C., Muller, D., Rocha, J.B.T., 2003a. 2,3-dimercaptopropene-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury and cadmium-induced inhibition of delta-aminolevulinic acid dehydratase. *Toxicology* 184, 85–95.
- Nogueira, C.W., Borges, V.C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2003b. Organochalogen effects on delta-aminolevulinic acid dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. *Toxicology* 191, 169–178.
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chemical Reviews* 104, 6255–6285.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358.
- Prast, H., Philippou, A., 2001. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology* 64, 51–68.
- Prigol, M., Wilhelm, E.A., Schneider, C.C., Nogueira, C.W., 2008. Protective effect of unsymmetrical dichalcogenide, a novel antioxidant agent, in vitro and in vivo model of brain oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*. doi:10.1016/j.cbi.2008.07.006, 2008.
- Posser, T., Moretto, M.B., Dafre, A.L., Farina, M., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., Zeni, G., Ferreira, J.S., Leal, R.B., Franco, J.L., 2006. Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: an in vitro evaluation. *Chemico-Biological Interactions* 164, 126–135.
- Rauhala, P., Khaldi, A., Mohanakumar, K.P., Chiueh, C.C., 1998. Apparent role of hydroxyl radicals in oxidative brain injury induced by sodium nitroprusside. *Free Radical Biology & Medicine* 24, 1065–1073.
- Reddy, C.S.S.S., Subramanyam, M.V.V., Vani, R., Devi, A.S., 2007. In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: effect of antioxidant supplements. *Toxicology in Vitro* 21, 1355–1364.
- Ren, X., Xue, Y., Zhang, K., Liu, J., Luo, G., Zheng, J., Mu, Y., Shen, J., 2001. A novel dicyclocodextrinyl ditelluride compound with antioxidant activity. *FEBS Letters* 507, 377–380.
- Rocha, J.B.T., Pereira, M.E., Emanuelli, T., Christofari, R.S., Souza, D.O., 1995. Effect of treatment with mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. *Toxicology* 100, 27–37.
- Sah, R., Galeffi, F., Ahrens, R., Jordan, G., Schwartz-Bloom, R.D., 2002. Modulation of the GABA(A)-gated chloride channel by reactive oxygen species. *Journal of Neurochemistry* 80, 383–391.
- Sahoo, R., Dutta, T., Das, A., Ray, S.S., Sengupta, R., Ghosh, S., 2006. Effect of nitrosative stress on *Schizosaccharomyces pombe*: inactivation of glutathione reductase by peroxynitrite. *Free Radical Biology & Medicine* 40, 625–631.
- Sassa, S., 1982. Delta aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28, 133–145.
- Savegnago, L., Borges, V.C., Alves, D., Jesse, C.R., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2006. Evaluation of antioxidant activity and potential toxicity of 1-butyltelurenyl-2-methylthioheptene. *Life Sciences* 79, 1546–1552.
- Seviand, A., McLeod, L., 1997. Formation and biological reactivity of lipid peroxidation products. In: Wallace, K.E. (Ed.), *Free Radical Toxicology*. Taylor and Francis, Washington, pp. 47–70.
- Weisinger, H., 2001. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Progress in Neurobiology* 64, 365–391.
- Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* 77, 325–333.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Analytical Biochemistry* 228, 349–351.
- Yerer, M.B., Aydogan, S., 2004. The in vivo antioxidant effectiveness of alpha-tocopherol in oxidative stress induced by sodium nitroprusside in rat red blood cells. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 30, 323–329.

CAPÍTULO 2

4.2. Capítulo 2: Resultados complementares

4.2.1. Materiais e Métodos:

4.2.1.1. Substâncias químicas:

Glutathiona reduzida (GSH) e 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) foram adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, USA). 1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) foi adquirido de Aldrich. Teluroacetilenos **a-d** foram preparados conforme métodos da literatura (Comasseto et al., 1996). Os compostos foram diluídos em dimetil sulfóxido (DMSO).

4.2.1.2. Atividade Mimética da Glutathiona S-Transferase (GST)

A reação de GSH com CDNB é de escolha para a medida da catálise que ocorre naturalmente pela enzima glutathiona S-transferase (Habig et al., 1974). A reação de um composto com CDNB demonstra a atividade mimética da GST. Teluroacetilenos **a-d** (10 – 60 μ M) foram incubados com 2 mM de GSH à 25°C por 3 min. O início da reação ocorreu pela adição de 1 mM de CDNB ao volume final de 1 ml de solução tampão fosfato de sódio, pH 6,9. A reação foi medida por 3 min à 340 nm. A diferença da leitura obtida e de um branco (sem teluroacetileno) foi apresentada como $\Delta A/\text{min}$. O composto ebselen (1 - 60 μ M) foi usado como controle positivo.

4.2.1.3. Radical ABTS^{•+}

A determinação do efeito *scavenger* de radical ABTS^{•+} pelos teluroacetilenos foi realizada de acordo com o método de Re et al. (1999), com algumas modificações. Inicialmente, o radical ABTS^{•+} foi gerado pela reação de 7 mM de solução ABTS^{•+} em água com 140 mM de persulfato de potássio no escuro por 12-16 horas. No dia do teste, a solução com o radical ABTS^{•+} pré-formado foi diluído 1:88 (1 ml radical ABTS^{•+} + 87 ml de tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7). O radical ABTS^{•+} foi adicionado aos teluroacetilenos **a-d** (1 – 60 μ M). Após 30 min à 25°C, a diminuição da absorbância foi medida à 734 nm, representando a atividade *scavenger* dos teluroacetilenos contra o radical ABTS^{•+}. O ácido ascórbico (1 – 60 μ M) foi usado como controle positivo. Os resultados foram apresentados como porcentagem do controle (sem o composto).

4.2.1.4. Auto-oxidação do Fe²⁺

A interação dos teluroacetilenos com ferro foi determinada como descrito por Yoshino e Murakami (1998), com algumas modificações. A reação foi iniciada pela adição de FeSO₄ 0,1 mM em amostras de 2 ml contendo Tris-HCl 10 mM pH 7,1 e teluroacetileno **a-d** (30 – 60 µM) na ausência ou presença de 0,1 mM de isocitrato. Após 40 min da adição de FeSO₄, alíquotas de 0,6 ml foram misturadas com 0,3 ml de 1,10-fenantrolina 1 mM e a absorbância foi medida à 540 nm. O ascorbato (0,1 mM) foi usado como controle positivo. Os resultados foram apresentados como porcentagem do controle sem o isocitrato e sem o composto.

4.2.1.5. Atividade *scavenger* de H₂O₂

A determinação da atividade *scavenger* de H₂O₂ foi realizada conforme Ruch et al. (1989), com algumas modificações. O princípio deste método consiste na diminuição na absorbância do H₂O₂ sob oxidação do H₂O₂. A solução de H₂O₂ 13 mM foi preparada em tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 ml de solução H₂O₂ (13 mM) em amostras de 2 ml contendo tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,4) e teluroacetileno **a-d** (1 – 60 µM). A absorbância foi medida a 230 nm. Trolox (1 - 60 µM) foi usado como controle positivo. Os resultados foram apresentados como porcentagem do controle (sem o composto).

4.2.1.6. Análises Estatísticas

Os resultados foram apresentados como média ± DP. Os resultados foram analisados por análise de variância de uma via seguida por teste de Duncan quando apropriado. Os valores de p<0,05 foram considerados significativos.

4.2.2. Resultados:

4.2.2.1. Atividade mimética da GST

Ebselen, o controle positivo, em concentrações iguais ou maiores que 10 µM apresentou atividade mimética da GST na presença de GSH (dados não mostrados). Entretanto, teluroacetilenos **a-d** não demonstraram esta atividade na presença de GSH em todas as concentrações analisadas (dados não mostrados).

4.2.2.2. Radical ABTS^{•+}

Teluroacetilenos **a-d** na concentração de 10 µM apresentaram atividade *scavenger* de radical ABTS^{•+}. Esta atividade foi semelhante àquela do ácido ascórbico, controle positivo, que apresentou atividade *scavenger* de radical ABTS^{•+} em 10 µM (**Tabela 1**).

4.2.2.3. Auto-oxidação do Fe²⁺

Teluroacetilenos **a-d**, quando incubados em todas as concentrações analisadas, não afetaram o estado reduzido do ferro (dados não mostrados). O isocitrato estimulou a auto-oxidação do Fe²⁺ a Fe³⁺ e o ascorbato, controle positivo, manteve o ferro na sua forma reduzida, inibindo a oxidação do Fe²⁺ mediada pelo isocitrato. Teluroacetilenos **a-d** em todas as concentrações analisadas não foram capazes de proteger contra a oxidação do Fe²⁺ (**Tabela 2**).

4.2.2.4. Atividade *scavenger* de H₂O₂

Teluroacetilenos **a-d** na concentração de 20 µM apresentaram atividade *scavenger* de H₂O₂. Esta atividade foi superior ao trolox, controle positivo, que apresentou atividade *scavenger* de H₂O₂ em 60 µM (**Tabela 3**).

Tabela 1. Efeito *scavenger* de radical ABTS^{•+} pelos compostos teluroacetilenos **a-d** e ácido ascórbico.

	Ácido Ascórbico µM	Teluroacetileno µM			
		a	b	c	d
1	103 ± 11	92 ± 6	96 ± 3	84 ± 20	89 ± 8
10	63 ± 15*	30 ± 17*	58 ± 12*	41 ± 25*	30 ± 19*
20	9 ± 6*	6 ± 8*	24 ± 23*	9 ± 13*	3 ± 3*
30	3 ± 2*	3 ± 3*	6 ± 4*	8 ± 9*	2 ± 1*
40	3 ± 2*	3 ± 3*	9 ± 6*	5 ± 6*	2 ± 2*
50	3 ± 2*	3 ± 3*	5 ± 1*	1 ± 2*	2 ± 2*
60	3 ± 2*	3 ± 3*	7 ± 1*	1 ± 2*	1 ± 2*

Os resultados são apresentados como média ± DP de quatro experimentos. Os valores estão apresentados como porcentagem do controle (100%). *Significa p<0,05 comparado com o respectivo controle (uma via ANOVA/Duncan).

Tabela 2. Efeito dos compostos teluroacetilenos **a-d** na auto-oxidação de ferro na presença de isocitrato.

	Teluroacetileno μM			
	a	b	c	d
Isocitrato	47 \pm 14	44 \pm 11	48 \pm 15	51 \pm 7
Ascorbato	84 \pm 17*	89 \pm 16*	81 \pm 21*	86 \pm 1*
30	53 \pm 14	44 \pm 12	54 \pm 16	62 \pm 19
40	59 \pm 23	45 \pm 9	51 \pm 20	66 \pm 19
50	60 \pm 18	47 \pm 9	54 \pm 19	64 \pm 9
60	63 \pm 28	54 \pm 6	52 \pm 24	61 \pm 17

Os resultados são apresentados como média \pm DP de quatro experimentos. Os valores estão apresentados como porcentagem do controle (100%). *Significa $p < 0,05$ comparado com o respectivo grupo isocitrato (uma via ANOVA/Duncan).

Tabela 3. Efeito *scavenger* de H_2O_2 pelos compostos teluroacetilenos **a-d** e trolox.

	Trolox μM	Teluroacetileno μM			
		a	b	c	d
1	101 \pm 2	100 \pm 1	99 \pm 4	96 \pm 5	100 \pm 2
10	99 \pm 4	94 \pm 1	94 \pm 2	98 \pm 4	95 \pm 2
20	99 \pm 2	90 \pm 2*	88 \pm 4*	89 \pm 3*	92 \pm 1*
30	96 \pm 3	90 \pm 1*	84 \pm 2*	85 \pm 6*	88 \pm 2*
40	95 \pm 3	84 \pm 3*	84 \pm 4*	76 \pm 4*	84 \pm 1*
50	93 \pm 5	84 \pm 4*	84 \pm 8*	76 \pm 8*	84 \pm 4*
60	91 \pm 2*	83 \pm 8*	85 \pm 4*	77 \pm 3*	83 \pm 1*

Os resultados são apresentados como média \pm DP de quatro experimentos. Os valores estão apresentados como porcentagem do controle (100%). *Significa $p < 0,05$ comparado com o respectivo controle (uma via ANOVA/Duncan).

5. DISCUSSÃO

Muitos autores tem demonstrado o potencial antioxidante de compostos orgânicos de telúrio em testes *in vitro*, bem como *ex vivo*, obtendo resultados promissores (Engman et al., 1995; Briviba et al., 1998; Jacob et al., 2000; Tiano et al., 2000, Kanski et al., 2001; Savegnago et al, 2006; Gay et al., 2009). Este trabalho demonstrou, pela primeira vez, que os compostos teluroacetilenos **a-d**, em baixas concentrações, apresentam atividade antioxidante em homogeneizado de cérebro de ratos *in vitro*, sendo que este efeito deve-se à atividade *scavenger* de RL e ERs. Além disso, o composto teluroacetileno **b** protegeu contra o dano oxidativo causado por SNP em cérebro de camundongos, confirmando o potencial antioxidante *in vivo* deste composto.

Sabe-se que a membrana é um dos componentes celulares mais suscetíveis à ação das ERs em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Consequentemente há perda da seletividade na troca iônica e formação de produtos citotóxicos (como o MDA), culminando com a morte celular (Halliwell, 1994; Pong, 2003).

Neste trabalho, demonstrou-se que compostos teluroacetilenos **a-d**, em baixas concentrações, protegem contra a peroxidação lipídica induzida por malonato ou SNP em homogeneizado de cérebro de ratos. A atividade pró-oxidante do malonato está relacionada à inibição da SDH e, em parte, à sua capacidade de formar complexos com ferro (Pong, 2003). Já o SNP age liberando NO[•] que contribui para causar estresse oxidativo e injúria no cérebro de ratos, além disso, SNP gera o radical citotóxico OH[•] via a reação de Fenton (Wagner et al., 2006). Os valores de CI₅₀ dos compostos **a-d** para peroxidação lipídica induzida tanto por malonato quanto por SNP seguem a ordem: a=b<c<d. Dessa forma, pode-se afirmar que o efeito antioxidante dos teluroacetilenos não depende da substância química utilizada para indução da peroxidação lipídica (malonato ou SNP).

Embora todos os compostos testados apresentem atividade antioxidante, pode-se considerar que a menor eficácia do composto **d** contra a peroxidação lipídica está associada à presença do grupamento hidroxila na sua estrutura química. De acordo com isto, dados mostram que o efeito antioxidante de organocalcogênios está associado as suas estruturas químicas (Meotti et al., 2004; Prigol et al., 2008).

Nas últimas décadas, inúmeros trabalhos tem sido publicados relacionando níveis aumentados de proteína carbonilada com várias doenças (Dalle-Donne et al., 2003). A formação de proteínas carboniladas resulta do estresse oxidativo, uma vez que ERs conduzem à oxidação de resíduos de aminoácidos, o que pode resultar na fragmentação das proteínas (Berlett e Stadtman, 1997). Neste estudo, as proteínas modificadas pelo estresse oxidativo induzido por SNP, demonstradas pelo aumento no conteúdo de carbonilas, foram reduzidas pelos compostos teluroacetilenos **a-d**. Ao contrário da diferença de efeito antioxidante no TBARS, as estruturas químicas dos teluroacetilenos não alteraram o efeito antioxidante na carbonilação de proteínas.

Estudos mostram que o principal mecanismo pelo qual os compostos organocalcogênicos exercem atividade antioxidante está relacionado ao efeito mimético da atividade da GPx (Meotti et al., 2004; Nogueira et al., 2004). Entretanto, o efeito antioxidante dos teluroacetilenos **a-d** em homogeneizado de cérebro de ratos não pode ser explicado pela atividade mimética da GPx, uma vez que estes compostos não apresentam esta atividade.

Autores tem demonstrado que a GST é uma defesa antioxidante enzimática e serve para proteger os tecidos contra o estresse oxidativo (Mosialou e Morgenstern, 1989; Hayes e Pulford, 1995; Fiander e Schneider, 1999). Então, um estudo utilizando o organocalcogênio ebselen demonstrou que o efeito mimético da atividade dessa enzima pode estar relacionado com o mecanismo antioxidante deste composto, e assim, explicar suas propriedades antioxidantes (Jung et al., 2002). Contudo, os teluroacetilenos **a-d** não possuem efeito mimético da atividade da GST (**Capítulo 2**).

O íon ferroso (Fe^{2+}) pode facilitar a produção de ERs nos sistemas animais e humanos, e a capacidade das substâncias de proteger contra a auto-oxidação do Fe^{2+} pode ser um mecanismo antioxidante delas (Puntel et al., 2008; 2009; Khomenko et al., 2009). Entretanto, os resultados obtidos no **Capítulo 2** mostram que a proteção contra a auto-oxidação do Fe^{2+} não está envolvida no mecanismo antioxidante dos teluroacetilenos **a-d**.

Substâncias *scavenger* de RL e ERs podem proteger contra as reações de peroxidação e, assim, proteger do estresse oxidativo (Soares et al., 1997). Dessa forma, fez-se necessário verificar se os teluroacetilenos **a-d** poderiam estar neutralizando RL e ERs que são gerados durante o estresse oxidativo. Os ensaios utilizando radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH \cdot) e 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) (ABTS $^{+\cdot}$) estão entre os métodos mais utilizados e mais populares para a determinação da capacidade e dos mecanismos antioxidantes. Neste estudo, os compostos teluroacetilenos **a-d** mostraram-se capazes de neutralizar o radical DPPH \cdot (**Capítulo 1**), bem como o radical cátion ABTS $^{+\cdot}$

(**Capítulo 2**), ambos a partir da concentração de 10 μM , resultado semelhante ao encontrado para o ácido ascórbico. Diversos trabalhos da literatura tem demonstrado o efeito *scavenger* de radicais DPPH \cdot e ABTS $^{+\cdot}$ de substâncias naturais derivadas de frutas, vegetais e ervas (Ak e Gulcin, 2008; Koksall e Gulcin, 2008; Koksall et al., 2009), da adrenalina (Gulcin, 2009), e de compostos sintéticos, tais como compostos orgânicos de selênio e telúrio (Acker et al., 2009).

O H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio, uma vez que não possui um elétron desemparelhado e é a maior fonte de ERs intracelulares (Mandelker, 2008). É gerado por vários processos, como pelas atividades da xantina e urato oxidase e como produto final da dismutação do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pela SOD, processo este mais ativo durante o estresse oxidativo (Murphy, 2009). Ainda, o H_2O_2 em excesso pode reagir com ferro e, via reação de Fenton, gerar OH^{\cdot} (Halliwell e Guttridge, 2003). Dessa maneira, o controle dos níveis de H_2O_2 é bastante importante durante o processo patogênico, a fim de reduzir os danos intra e extracelulares. No presente estudo, observou-se que os compostos teluroacetilenos **a-d** possuem atividade *scavenger* de H_2O_2 a partir de 20 μM e esse efeito foi superior ao do trolox, o controle positivo (**Capítulo 2**).

Tendo em vista que os compostos teluroacetilenos **a-d** possuem atividade antioxidante em baixas concentrações e este efeito deve-se a sua capacidade *scavenger*, verificou-se a atividade da enzima δ -ALA-D, como um parâmetro de toxicidade.

A δ -ALA-D, uma enzima sulfidrílica que catalisa a condensação assimétrica de duas moléculas de ácido aminolevulínico em porfobilinogênio, é um dos alvos dos compostos orgânicos de telúrio mais estudado. Esta enzima possui no seu sítio ativo dois resíduos cisteinil, que são facilmente oxidados *in vitro* e *in vivo* por compostos de telúrio orgânicos, levando a sua inibição (Maciel et al., 2000; Meotti et al., 2003; Nogueira et al., 2003b). Esta inativação impede a continuação da cascata de síntese de grupamentos heme, importantes na síntese de hemoglobina, citocromos e da enzima catalase. Além disso, esta inibição leva ao acúmulo do substrato da δ -ALA-D, o ácido aminolevulínico, que tem ação pró-oxidante (Bechara et al., 1993; Emanuelli et al., 2001). O presente estudo mostra que os teluroacetilenos **a-d** inibem a atividade da δ -ALA-D no homogeneizado de cérebro de rato, mas essa inibição ocorre somente em concentrações maiores do que aquelas necessárias para o efeito antioxidante.

Uma vez que a atividade da δ -ALA-D é altamente sensível à presença de compostos capazes de oxidar seus grupos sulfidrílicos (Rocha et al., 1995; Rodrigues et al., 1996; Nogueira et al., 2003 a, c), e também é sensível a compostos capazes de remover os íons zinco

de sua estrutura (Beber et al., 1998; Emanuelli et al., 1998; Jaffe, 2000), uma maneira de se estudar o mecanismo de inibição enzimática pelos teluroacetilenos **a-d** seria utilizar o DTT, como agente redutor e o $ZnCl_2$. Neste trabalho foi demonstrado que o agente redutor ditiol DTT reverteu a inibição da δ -ALA-D causada pelos teluroacetilenos **a-d** em homogeneizado de cérebro de rato. Ao contrário, o $ZnCl_2$ não foi eficiente em restaurar a atividade da enzima inibida por estes compostos. Sendo assim, os resultados sugerem que os compostos teluroacetilenos **a-d** inibem a atividade da δ -ALA-D por interagir com os grupos $-SH$ da enzima, e não por remover os íons zinco, os quais são essenciais para a atividade desta.

Baseado nos resultados *in vitro*, em que todos os teluroacetilenos estudados apresentam atividade antioxidante, o teluroacetileno **b** foi escolhido para o estudo protetor contra o dano oxidativo induzido por SNP em cérebro de camundongos. O cérebro é particularmente suscetível aos efeitos causados pelo estresse oxidativo do que outros tecidos devido ao alto consumo de oxigênio (Sah et al., 2002). Além disso, o cérebro possui altas concentrações de ácidos graxos poliinsaturados facilitando o início e a propagação dos processos oxidativos (Seviand e McLeod, 1997).

O SNP, doador de NO^* , é um bom indutor de peroxidação lipídica no cérebro. Neste estudo, foi demonstrado um aumento na peroxidação lipídica em cérebro de camundongos após a administração de SNP. Este aumento nos níveis de TBARS pode ser devido à diminuição dos sistemas antioxidantes cerebrais, ocasionado pela alta suscetibilidade do tecido cerebral à peroxidação lipídica. Apesar disso, o teluroacetileno **b** foi capaz de proteger contra o aumento dos níveis de TBARS induzidos pelo SNP.

Os camundongos tratados com SNP apresentaram inibição da atividade da GR, uma enzima importante para a manutenção da concentração intracelular de GSH (Halliwell and Gutteridge, 2007). Este resultado está de acordo com outro trabalho (Sahoo et al., 2006; Prigol et al., 2008), confirmando a redução da atividade da GR pelo SNP. Contudo, o teluroacetileno **b** não foi capaz de proteger contra a diminuição da atividade desta enzima. Outro resultado interessante deste trabalho foi a inibição da atividade da GST no cérebro de camundongos tratados com SNP e a capacidade do teluroacetileno **b** em proteger contra esta inibição. A GST é uma enzima de metabolização de fase II (Hayes e Pulford, 1995) que está amplamente distribuída em diversos tecidos. Essa enzima promove a conjugação de GSH com uma grande variedade de compostos eletrofílicos resultando na formação de substâncias que são facilmente excretadas do corpo (Cervello et al., 1992). Além disso, muitos autores tem demonstrado que a GST é uma defesa antioxidante enzimática e serve para proteger os tecidos contra o estresse oxidativo (Fiander e Schneider, 1999; Luchese et al., 2008). A inibição da

atividade das enzimas GR e GST causada pelo SNP pode estar associado com o aumento da peroxidação lipídica observado neste trabalho.

A atividade da δ -ALA-D foi inibida pelo SNP e esta inibição pode estar relacionada ao aumento do dano oxidativo no cérebro e à diminuição nas defesas antioxidantes. A δ -ALA-D é uma enzima extremamente sensível a situações associadas com o estresse oxidativo em diferentes tecidos de roedores (Maciel et al., 2000; Meotti et al., 2003; Nogueira et al., 2004; Luchese et al., 2007). O teluroacetileno **b**, ao proteger contra o aumento da peroxidação lipídica, foi capaz de proteger contra a inibição da atividade da δ -ALA-D.

Os resultados deste trabalho também demonstram que a administração de SNP não altera as atividades das enzimas CAT e GPx no cérebro dos camundongos, estes resultados estão de acordo com dados descritos na literatura (Yerer and Aydogan, 2004; Posser et al., 2006; Prigol et al., 2008). Consequentemente, é possível que CAT e GPx não estejam envolvidas na proteção contra o dano oxidativo causado pelo SNP.

Teluroacetileno **b** restaura os níveis de TBARS e as atividades das enzimas δ -ALA-D e GST que foram alteradas pela administração de SNP, demonstrando o efeito antioxidante deste composto contra o estresse oxidativo no cérebro de camundongos. Estes dados estão de acordo com os resultados de Ávila et al. (2007) que mostram uma potente atividade antioxidante de um telureto vinílico em camundongos. A redução da atividade da GST pode ter ocorrido devido ao dano oxidativo ocasionado pelo acúmulo de produtos tóxicos. Neste estudo, houve uma redução significativa na atividade da GST no cérebro de camundongos tratados com SNP e essa redução foi recuperada próximo aos valores normais pelo tratamento com teluroacetileno **b**. Por essa razão, a diminuição da peroxidação lipídica poderia estar associada com o aumento da atividade das enzimas antioxidantes.

Além disso, o teluroacetileno **b** aumentou a atividade da GPx no cérebro dos camundongos. Sabe-se que compostos de telúrio podem estimular a síntese da GPx. Gaberg et al. (1999) demonstraram que o telúrio poderia deslocar o selênio das selenoproteínas, como a GPx, alterando a atividade enzimática. É possível que o aumento da atividade da GPx pelo teluroacetileno **b** esteja envolvido nos mecanismos pelos quais este composto apresenta atividade antioxidante. GPx é uma selenoenzima antioxidante que reduz uma variedade de hidroperóxidos às custas de GSH e/ou outros equivalentes redutores (Brigelius-Flohe, 1999).

6. CONCLUSÕES

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

- Os compostos teluroacetilenos **a-d**, em baixas concentrações, protegem contra o aumento da peroxidação lipídica induzida por malonato e SNP e, também, protegem contra o aumento de proteínas carboniladas induzido por SNP em homogeneizado de cérebro de ratos *in vitro*.

- Investigando os possíveis mecanismos envolvidos na ação antioxidante dos compostos teluroacetilenos **a-d**, observa-se que estes compostos não possuem atividade mimética da GPx e GST.

- Os compostos teluroacetilenos **a-d** não protegem contra a auto-oxidação do Fe^{2+} .

- As atividades *scavenger* de radicais $ABTS^{++}$ e $DPPH^{\bullet}$ e *scavenger* de H_2O_2 estão envolvidas no efeito antioxidante dos teluroacetilenos **a-d**.

- Os teluroacetilenos **a-d** inibem a atividade da δ -ALA-D no homogeneizado de cérebro de rato *in vitro*, em concentrações 50 ou 100 vezes maior que aquelas necessárias para o efeito antioxidante. A oxidação dos grupos $-SH$ presentes na estrutura da δ -ALA-D está envolvida no mecanismos de inibição enzimática pelos teluroacetilenos.

- O teluroacetileno **b**, quando pré-administrado por via oral em camundongos, protege contra o aumento nos níveis de TBARS e contra a inibição da atividade das enzimas GST e δ -ALA-D causados pelo SNP. Além disso, o teluroacetileno **b** aumenta *per se* a atividade da enzima GPx.

7. PERSPECTIVAS

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

- Avaliar o efeito do teluroacetileno **b** na melhora da memória em camundongos.
- Investigar os possíveis mecanismos envolvidos na melhora da memória pelo teluroacetileno **b** em camundongos.
- Estudar o efeito protetor do teluroacetileno **b** frente a drogas que induzem perda de memória em camundongos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKER, C.A., BRANDÃO, R., ROSÁRIO, A.R., NOGUEIRA, C.W. Antioxidant effect of alkynylselenoalcohol compounds on liver and brain of rats in vitro. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 28, 280-287, 2009.
- AK, T., GULCIN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chem. Biol. Interact.** 174, 27-37, 2008.
- ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. **Molecular Biology cell.** 3^a ed, New York & London: Garland Publishing, 1994.
- ALEXI, T., BORLONGAN, C., FAULL, C., WILLIAMS, C., CLARK, R., GLUCKMAN, P., HUGHES, P. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. **Prog. Neurobiol.** 60, 409-470, 2000.
- AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K., HAGEN, T.M. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 90, 7915-7922, 1993.
- ANDERSSON, C.M., HALLBERG, A., BRATTSAND, R., COTGREAVE, I.A., ENGMAN, L., PERSON, J. Glutathione peroxidase-like activity of diaryl tellurides. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 3, 2553-2558, 1993.
- AUGUSTO, O. Radicais livres: bons, maus e naturais. **Oficina de textos.** 2006.
- ÁVILA, D.S., BEQUE, M.C., FOLMER, V., BRAGA, A.L., ZENI, G., NOGUEIRA, C.W., SOARES, F.A.A., ROCHA, J.B.T. Diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate: an organotellurium compound with low toxicity. **Toxicology** 224, 100-107, 2006.
- ÁVILA, D.S., GUBERT, P., DALLA CORTE, C.L., ALVES, D., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B., SOARES, F.A. A biochemical and toxicological study with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate in a sub-chronic intraperitoneal treatment in mice. **Life Sci.** 80, 1865-1872, 2007.
- ÁVILA, D.S., GUBERT, P., PALMA, A., COLLE, D., ALVES, D., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B., SOARES, F.A. Na organotellurium compound with antioxidant activity against excitotoxic agents without neurotoxic effects in brain of rats. **Brain Res. Bull.** 76, 114-123, 2008.
- AZBILL, R.D., MU, X.J., BRUCEKELLER, A.J., MATTSON, M.P., SPRINGER, J.E. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. **Brain Res.** 765:283-290, 1997.
- BARBOSA, N.B.V, ROCHA, J.B.T, ZENI, G., EMANUELLI, T., BEQUE, M.C., BRAGA, A.L. Effect of organic forms of selenium on δ -aminolevulinatase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 149, 243-253, 1998.
- BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M., DAVID, J.P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova** 29, 113-123, 2006.

- BATES, J.N., BAKER, M.T., GUERRA, R., HARRISON, D.G. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. Evidence that reduction of the nitroprusside anion and cyanide loss are required. **Biochem. Pharmacol.** 42, 157-165, 1991.
- BEBER, F.A., WOLLMEISTER, J., BRIGO, M.J.K, SILVA, M.C.J., PEREIRA, C.N., ROCHA, J.B.T. δ -Aminolevulinate dehydratase inhibition by ascorbic acid is mediated by an oxidation system existing in the hepatic supernatant. **Int. J. Vitam. Nutr. Res.** 68, 181-188, 1998.
- BECHARA, E.J.H., MEDEIROS, M.H.G., MONTEIRO, H.P., HERMES-LIMA, M., PEREIRA, B., DEMASI, M., COSTA, C.A., ADBALLA, D.S.P., ONUKI, J., WENDEL, C.M.A., MASCIO, P.D. A free radical hypothesis of lead poisoning and inborn porphyrias associated with 5-aminolevulinic acid overload. **Quimica Nova** 16, 385-392, 1993.
- BERLETT, B.S., STADTMAN, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. **J. Biol. Chem.** 272, 20313-20316, 1997.
- BLAIS, F.X., ONISCHUK, R.T., DE MEIO, R.H. Hemolysis by tellurite: I: The tellurite test for hemolysis. **J. AOA** 73, 1972.
- BIXBY, M., SPIELER, L., MENINI, T., GUGLIUCCI, A. Ilex paraguariensis extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. **Life Sci.** 77, 345-358, 2005.
- BORGES, V.C., ROCHA, J.B., NOGUEIRA, C.W. Effect of diphenyl diselenide, dipheyl ditelluride and ebselen on cerebral Na^+, K^+ -ATPase activity in rats. **Toxicology** 215, 191-197, 2005.
- BORGES, V.C., SAVEGNAGO, L., PINTON, S., JESSE, C.R., ALVES, D., NOGUEIRA, C.W. Vinylic telluride derivatives as promising pharmacological compounds with low loxicity. **J. Appl. Toxicol.** 28, 839-848, 2008.
- BRAGA, A.L., ALBERTO, E.E., SOARES, L.C., ROCHA, J.B.T., SUDATI, J.H., ROOS, D.H. Synthesis of telluroamino acid derivatives with remarkable GPx like activity. **Org. Biomol. Chem.** 7, 43-45, 2009.
- BRIGELIUS-FLOHE, R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radic. Biol. Med.** 27, 951-965, 1999.
- BRIVIBA, K., TAMLER, R., KLOTZ, L-O., ENGMAN, L., COTGREAVE, I.A., SIES, H. Protection against organotellurium compounds against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration reactions. **Biochem. Pharmacol.** 55, 817-823, 1998.
- CERVELLO, I., LAFUENTE, A., GIRALT, M., MALLOL, J. Enhanced glutathione S-transferase (GST) activity in pregnant rats treated with benzo(a)pyrene. **Placenta** 13, 273-280, 1992.

- CHASSEAUND, L.F. The role of glutathione and glutathione S-transferase in the chemicals carcinogens and other electrophilic agents. **Adv. Cancer Res.** 29, 175-274, 1979.
- COMASSETO, J.V., MENEZES, P.H., STEFANI, H.A., ZENI, G., BRAGA, A.L. Addition of hydrogen halides to acetylenic selenides. Synthesis of 1-halo-1-selenoalkenes. **Tetrahedron** 52, 9687-9702, 1996.
- COMASSETO, J.V., LING, L.W., PETRAGNANI, N., STEFANI, H.A. Vinylic selenides and tellurides – preparations, reactivity and synthetic applications. **Synthesis** 4, 373, 1997.
- CUNHA, L.O.R., URANO, M.E., CHAGAS, J.R., ALMEIDA, P.C., BINCOLETTO, C., TERSARIOL, I.L.S., COMASSETO, J.V. Tellurium-based cysteine protease inhibitors: evaluation of novel organotellurium (IV) compounds as inhibitors of human cathepsin B. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 15, 755-760, 2005.
- DALLE-DONE, I., ROSSI, R., GIUSTARINI, D., MILZANI, A., COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin. Chim. Acta** 329, 23-38, 2003.
- DARLEY-USMAR, V.M., WISEMAN, H., HALLIWELL, B. Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. **FEBS Lett.** 369, 131-135, 1995.
- DAWSON, V.L., DAWSON, T.M. Free radicals and neuronal cell death. **Cell Death and Differ.** 3, 71-78, 1996.
- DEDEOGLU, A., FERRANTE, R.J., ANDREASSEN, O.A., DILLMANN, W.H., BEAL, M.F. Mice overexpressing 70-kda heat shock protein show increased resistance to malonate and 3-nitropropionic acid. **Exp. Neurol.** 176, 262-265, 2002.
- DEUTICKE, B., LÜTKEMEIER, P., POSE, B. Tellurite-induced damage of the erythrocyte membrane. Manifestations and mechanisms. **Biochim. Biophys. Acta** 1109, 97-107, 1992.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** 82, 47-95, 2002.
- EMANUELLI, T., ROCHA, J.B.T., PEREIRA, M.E., NASCIMENTO, P.C., BEBER, F.A., SOUZA, D.O.G. Delta-aminolevulinic acid dehydratase inhibition by 2,3-dimercaptopropanol is mediated by chelation of zinc from a site involved in maintaining cysteinyl residues in a reduced state. **Pharmacol. Toxicol.** 83, 95-103, 1998.
- EMANUELLI, T., PAGEL, F.W., ALVES, L.B., REGNER, A., SOUZA, D.O. Inhibition of adenylate cyclase activity by 5-aminolevulinic acid in rat and human brain. **Neurochem. Int.** 38, 213-218, 2001.
- ENGMAN, L., STERN, D., COTGREAVE, I.A., ANTERSSON, C.M. Thiol peroxidase activity of diaryl ditellurides as determined by a ¹H NMR method. **J. Am. Chem. Soc.** 114, 9737-9743, 1992.

- ENGMAN, L., PERSSON, J., VESSMAN, K., EKSTROM, M., BERGLUND, M., ANDERSSON, C.M. Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. **Free Radic. Biol. Med.** 19, 441-452, 1995.
- ENGMAN, L., KANDA, T., GALLEGOS, A., WILLIAMS, R., POWIS, G. Watersoluble organotellurium compounds inhibit thioredoxin reductase and the growth of human cancer cells. **Anti-Cancer Drug** 15, 323-330, 2000.
- ENGMAN, L., AL-MAHARIK, N., MCNAUGHTON, M., BIRMINGHAM, A., POWIS, G. Thioredoxin reductase and cancer cell growth inhibition by organotellurium compounds that could be selectively incorporated into tumor cells. **Bioorg. Med. Chem.** 11, 5091-5100, 2003.
- FAIRHILL, L.T. Tellurium. In: **Industrial Toxicology**. Hafner Publishing Co, New York & London, pp. 120, 1969.
- FERREIRA, A.L., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ver. Ass. Med. Brasil* 43, 61-68, 1997.
- FIANDER, H., SCHNEIDER, H. Compounds that induce isoforms of glutathione S-transferase with properties of a critical enzyme in defense against oxidative stress. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 262, 591-595, 1999.
- FRIDOVICH I. Superoxide dismutases. **Ann. Rev. Biochem.** 44, 147-157, 1975.
- GARBERG, P., ENGMAN, L., TOLMACHEV, V., LUNDQVIST, H., GERDES, R.G., COTGREAVE, I.A. Binding of tellurium to hepatocellular selenoproteins during incubation with inorganic tellurite: consequences for the activity of selenium-dependent glutathione peroxidase. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 31, 291-301, 1999.
- GAY, B.M., LUCHESE, C., NOGUEIRA, C.W., WENDLER, P., MACEDO, A., DOS SANTOS, A.A. Antioxidant effect of functionalized alkyl-organotellurides: a study in vitro. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.** 2009. DOI: 10.3109/14756360903257892
- GOODRUM, J.F. Role of organotellurium species in tellurium neuropathy. **Neurochem. Res.** 10, 1313-1319, 1998.
- GRAF, E., MAHONEY, J.R., BRYANT, R.G., EATON, J.W. Iron-catalyzed hydroxyl radical formation. Stringent requirement for free iron coordination site. **J. Biol. Chem.** 259, 3620-3624, 1984.
- GREEN, M., HARWOOD, H., BARROWMAN, C., RAHMAN, P., EGGEMAN, A., FESTRY, F., DOBSON, P., NG, T. A facile route to CdTe nanoparticles and their use in bio-labelling. **J. Mater. Chem.** 17, 1989-1994, 2007.
- GREENE, J.G., PORTER, R.H.P., ELLER, R.V., GREENAMYRE, J.T. Inhibition of succinate dehydrogenase by malonic acid produces an excitotoxic lesion in rat striatum. **J. Neurochem.** 61, 1151-1154, 1993.

- GROGAN, T.M., FENOGLIO-PIRESER, C., ZEHEB, R., BELLAMY, W., FRUTIGER, Y., VELA, E., STEMMERMAN, G., MACDONALD, J., RICHTER, L, GALLEGOS, A., POWIS, G. Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. **Hum. Pathol.** 31, 475-481, 2000.
- GULCIN, I. Antioxidant activity of L-adrenaline: A structure-activity insight. **Chem. Biol. Interact.** 179, 71-80, 2009.
- HABER, F., WEISS, J. On the catalysis of hydroperoxide. **Naturwissenschaften** 20, 948-950, 1932.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.** 249, 7130-7139, 1974.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**, 59, 1609-1623, 1992.
- HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? **Lancet** 344, 721-724, 1994.
- HALLIWELL, B., ZHAO, K., WHITEMAN, M. Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. **Free Radic. Res.** 31, 651-669, 1999.
- HALLIWELL, B., GUTTERRIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine:** Oxford University Press. 2003.
- HALLIWELL, B., GUTTERRIDGE, J.M.C. Free radicals in Biology and medicine, fourth ed. Clarendon Press, **Oxford Science Publications**, Oxford/UK, 2007.
- HARRISON, D.G., BATES, J.N. The nitrovasodilators. New ideas about old drugs. **Circulation** 87, 1461-1467, 1993.
- HAYES, J.D., PULFORD, D.J. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.** 30, 445-600, 1995.
- HAYUN, M., NAOR, Y., WEIL, M., ALBECK, M., PELED, A., DON, J., HARANGHERA, N., SREDNI, B. The immunomodulator AS101 induces growth arrest and apoptosis in multiple myeloma: association with the Akt/survivin pathway. **Biochem. Pharmacol.** 72, 1423-1431, 2006.
- JACOB, C., ARTEEL, G.E., KANDA, T., ENGMAN, L., SIES, H. Water soluble organotellurium compounds: catalytic protection against peroxynitrite and release of zinc from metallothionein. **Chem. Res. Toxicol.** 13, 3-9, 2000.
- JAFFE, E.K. The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. **Acta Crystallogr. D.** 56, 115-128, 2000.

- JOHNSON, I.T. New approaches to the role of diet in the prevention of cancers of the alimentary tract. **Mutat. Res.** 551, 9-28, 2004.
- JOSEPHY, P.D. *Molecular Toxicology*, New York: Oxford University Press, 1997.
- JUNG., C.H., WASHBURN, M.P., WELLS, W.W. Ebselen has dehydroascorbate reductase and thioltransferase-like activities. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 291, 550-553, 2002.
- KANDA, T., ENGMAN, L., COTGREAVE, I.A., POWIS, G. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. **J. Org. Chem.** 64, 8161-8169, 1999.
- KANSKI, J., DRAKE, J., AKSENOVA, M., ENGMAN, L., BUTTERFIELD, D.A. Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(N,N-dimethylamino)benzenetellurenyl]propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. **Brain Res.** 911, 12-21, 2001.
- KHOMENKO, T., SZABO, S., DENG, X., ISHIKAWA, H., ANDERSON, G., MCLAREN, G. Role of iron in the pathogenesis of cysteamine-induced duodenal ulceration in rats. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** 296, G1277-G1286, 2009.
- KLAMAN, D. **Organotellurium compounds**. In: (Ed.). *Methods of Organic Chemistry*. New York: George Thieme Verlag Stuttgart, 1990.
- KOKSAL, E., GULCIN, I. Antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea L.*). **Turk. J. Agric. For.** 32, 65-78, 2008.
- KOKSAL, E., GULCIN, I., BEYZA, S., SARIKAYA, O., BURSAL, E. In vitro antioxidant activity of silymarin. **J. Enzym. Inhib. Med. Ch.** 24, 395-405, 2009.
- LANDEN, B.P., PORTER, T.D. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. **J. Lipid Res.** 42, 235-240, 2001.
- LARNER, A.J. How does garlic exert its hypocholesterolaemic action? The tellurium hypothesis. **Med. Hypothesis.** 44, 295-297, 1995.
- LEE, J., GODON, C., LAGNIEL, G., SPECTOR, D., GARIN, J., LABARRE, J., TOLEDANO, M.B. Yap1 and skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. **J. Biol. Chem.** 274, 16040-16046, 1999.
- LEVINE, R.L., WILLIAMS, J.A., STADTMAN, E.R., SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Meth. Enzymol.** 233, 346-357, 1994.
- LOHR, J.B. Oxygen radicals and neuropsychiatric illness-some speculations. **Arch Gen Psychiatry** 48, 1097-1106, 1991.

- LUCHESE, C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., SANTOS, F.W. Cadmium inhibits δ -aminolevulinate dehydratase from rat lung in vitro: interaction with chelating and antioxidant agents. **Chem. Biol. Interact.** 165, 127-137, 2007.
- LUCHESE, C., STANGHERLIN, E.C., GAY, B.M., NOGUEIRA, C.W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: involvement of glutathione. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 72, 248-254, 2009.
- MACIEL, E.N., BOLZAN, R.C., BRAGA, A.L., ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of mice. **J. Biochem. Mol. Toxicol.** 14, 310-319, 2000.
- MANDELKER, L. Introduction to oxidative stress and mitochondrial dysfunction. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract** 38, 1-30, 2008.
- MARAGOS, W.F., SILVERSTAIN, F.S. The mitochondrial inhibitor malonate enhances NMDA toxicity in the neonatal rat striatum. **Develop. Brain Res.** 88, 117-121, 1995.
- MARKS, D.B., MARKS, A.D., SMITH, C.M. **Basic medical biochemistry**: Williams & Wilkins, Baltimore, 336, 1996.
- MEOTTI, F.C., BORGES, V.C., ZENI, G., ROCHA, J.B., NOGUEIRA, C.W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. **Toxicol. Lett.** 143, 9-16, 2003.
- MEOTTI, F.C., STANGHERLIN, E.C., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environ. Res.** 94, 276-282, 2004.
- MISHRA, B., PRIYADARSINI, K.I., MOHANA, H., MUGESH, G. Horseradish peroxidase inhibition and antioxidant of ebselen and related organoselenium compounds. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 16, 5334-5338, 2006.
- MOSIALOU, E., MORGENSTERN, R. Activity of rat liver microsomal glutathione transferase toward products of lipid peroxidation and studies of the effect of inhibitors on glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.** 275, 289-294, 1989.
- MÜLLER, R., ZSCHIESCHE, W., STEFFEN, H., SCHALLER, K. Tellurium intoxication. **Klin. Wochenschr.** 67, 1152-1155, 1989.
- MURPHY, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J.** 417, 1-13, 2009.
- NOGUEIRA, C.W., ROTTA, L.N., ZENI, G., SOUZA, D.O., ROCHA, J.B. Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes. **Neurochem. Res.** 27, 283-288, 2002.
- NOGUEIRA, C.W., BORGES, V.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organochalcogens effects on δ -aminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. **Toxicology** 191, 169-178, 2003a.

- NOGUEIRA, C.W., MEOTII, F.C., CURTE, E., PILISSAO, C., ZENI, G., ROCHA, J.B. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology** 183, 29-37, 2003b.
- NOGUEIRA, C.W., SOARES, F.A., NASCIMENTO, P.C., MULLER, D., ROCHA, J.B.T. 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium- induced inhibition of δ -aminolevulinatase. **Toxicology** 184, 85-95, 2003c.
- NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem. Rev.** 104, 6255-6285, 2004.
- OHKAWA, H., OHISHI, H., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal. Biochem.** 95, 351-358, 1979.
- OKORONKWO, A.E., GODOI, B., SHUMACHER, R.F., NETO, J.S.S., LUCHESE, C., PRIGOL, M., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G. Csp³-tellurium copper cross-coupling: synthesis of alkynyl tellurides a novel class of antidepressive-like compounds. **Tetrahedron Lett.** 50, 909-915, 2009.
- PETRAGNANI, N. In: **Comprehensive Organometallic Chemistry II** (Ed. A. Mckillop), vol. LI, Pergamon Press, Exeter, UK. 1995.
- PIANTADOSI, C.A., ZHANG, J. Mitochondrial generation of reactive oxygen species after brain ischemia in the rat. **Stroke** 27, 327-332, 1996.
- PONG, K. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: therapeutic implications for superoxide dismutase mimetics. **Exp. Opin. Biol. Ther.** 3, 127-139, 2003.
- POSSER, T., MORETTO, M.B., DAFRE, A.L., FARINA, M., ROCHA, J.B.T., NOGUEIRA, C.W., ZENI, G., FERREIRA, J.S., LEAL, R.B., FRANCO, J.L. Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: an in vitro evaluation. **Chem. Biol. Interact.** 164, 126-135, 2006.
- PRIGOL, M., WILHELM, E.A., SCHNEIDER, C.C., NOGUEIRA, C.W. Protective effect of unsymmetrical dichalcogenide, a novel antioxidant agent, in vitro and an in vivo model of brain oxidative damage. **Chem. Biol. Interact.** 176, 129-136, 2008.
- PUNTEL., G.O., GUBERT., P., PERES, G.L., BRESOLIN, L., ROCHA, J.B.T., PEREIRA, M.E., CARRATU, V.S., SOARES, F.A.A. Antioxidant properties of oxime 3-(phenylhydrazono) butan-2-one. **Arch. Toxicol.** 82, 755-762, 2008.
- PUNTEL, G.O., DE CARVALHO, N.R., GUBERT, P., PALMA, A.S., CORTE, C.L.D., AVILA, D.S., PEREIRA, M.E., CARRATU, V.S., BRESOLIN, L., DA ROCHA, J.B.T., SOARES, F.A.A. Butane-2,3-dionethiosemicarbazone: Na oxime with antioxidant properties. **Chem. Biol. Interact.** 177, 153-160, 2009.
- RAMOS, G.R., ALVES, A.L.H., HERMES-LIMA, M. Radicais livres, antioxidantes e adaptabilidade animal. In: El-Hani CN; Videira AAP. (Org.). **O Que é Vida? Para**

Entender a Biologia do Século XXI. Rio de Janeiro: Editora Relume Dumará, 209-231, 2000.

- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying na improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med.** 26, 1231-1237, 1999.
- REN, X., XUE, Y., ZHANG, K., LIU, J., LUO, G., ZHENG, J., MU, Y., SHEN, J. A novel dicyclodextrinyl ditelluride compound with antioxidant activity. **FEBS Lett.** 507, 377-380, 2001.
- ROCHA, J.B.T., PEREIRA, M.E., EMANUELLI, T., CHRISTOFARI, R.S., SOUZA, D.O. Effect of treatment with Mercury chloride and lead acetate during the second stage of rapid postnatal brain growth on delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in brain, liver, kidney and blood of suckling rats. **Toxicology** 100, 27-37, 1995.
- RODRIGUES, A.L.S., ROCHA, J.B.T., PEREIRA, M.E., SOUZA, D.O. Delta Aminolevulinic acid dehydratase activity in weanling and adult rats exposed to lead acetate. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 57, 47-53, 1996.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, E., CAMACHO, A., MALDONADO, P.D., PEDRAZA-CHAVERRI, J., SANTAMARIA, D., GALVAN-ARZATE, S., SANTAMARIA, A. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. **Brain Res.** 858, 436-439, 2000.
- RUCH, R.J.; CHENG, S.J.; KLAUNIG, J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. **Carcinogenesis** 10, 1003-1008, 1989.
- SAH, R., GALEFFI, F., AHRENS, R., JORDAN, G., SCHWARTZ-BLOOM, R.D. Modulation of the GABA(A)-gated chloride channel by reactive oxygen species. **J. Neurochem.** 80, 383-391, 2002.
- SAHOO, R., DUTTA, T., DAS, A., RAY, S.S., SENGUPTA, R., GHOSH, S. Effect of nitrosative stress on Schizosaccharomyces pombe: inactivation of glutathione reductase by peroxyxynitrite. **Free Radic. Biol. Med.** 40, 625-631, 2006.
- SANTAMARÍA, A., SALVATIERRA-SANCHEZ, R., VAZQUEZ-ROMAN, B., SANTIAGO-LOPEZ, D., VILLEDA-HERNANDEZ, J., GALVAN-ARZATES, S., JIMENEZ-CAPDEVILLE, M.E., ALI, S.F. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vitro and in vivo studies. **J. Neurochem** 86, 479-488, 2003.
- SAVEGNAGO, L., BORGES, V.C., ALVES, D., JESSE, C.R., ROCHA, J.B., NOGUEIRA, C.W. Evaluation of antioxidant activity and potential toxicity of 1-buthyltelurenyl-2-methylthioheptene. **Life Sci.** 79, 1546-1552, 2006.
- SCANSETTI G. Exposure to metals that have recently come into use. **Sci. Total Environ.** 120, 85-91, 1992.

- SCHOROEDER, H.A., BUCKMAN, J., BALASSA, J.J. Abnormal trace elements in man: tellurium. **J. Chronic Dis.** 20, 147-161, 1967.
- SCHULZ, J.B., HUANG, P.L., MATTHEWS, R.T., PASSOV, D., FISHMAN, M.C., BEAL, M.F. Striatal malonate lesions are attenuated in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. **J. Neurochem.** 67, 430-433, 1996.
- SEVIAND, A., MCLEOD, L. Formation and biological reactivity of lipid peroxidation products. In: **Wallace KE (Ed) Free Radical Toxicology**, Taylor and Francis, Washington, 47-70, 1997.
- SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.** 62, 1315-1321, 1995.
- SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.** 82, 291-295, 1997.
- SLATER, T.F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Meth. Enzymol.** 105, 283-293, 1984.
- SOARES, J.R., DINS, T.C.P., CHUNHA, A.P., AMEIDA, L.M. Antioxidant activity of some extracts of *Thymus zygis*. **Free Radic. Res.** 26, 469-478, 1997.
- SOUZA, A.C.G., STANGHERLIN, E.C., ARDAIS, A.P., NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride: neurotoxic effect in brain of young rats, in vitro. **Mol. Cell Biochem.** 2010. DOI: 10.1007/s11010-010-0416-7
- SREDNI, B., CASPI, R.R., KLEIN, A., KALECHMAN, Y., DANZIGER, Y., BEN YA'AKOV, M., TAMARI, T., SHALIT, F., ALBECK, M. A new immunomodulating compound (AS-101) with potential therapeutic application. **Nature** 330, 173-176, 1987.
- STADTMAN, E.R. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. **Annu. Rev. Biochem.** 62, 797-821, 1993.
- STEFFEN, Y., SCHEWE, T., SIES, H. Epicatechin protects endothelial cells against oxidized LDL and maintains NO synthase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 331, 1277-1283, 2005.
- TAYLOR, A. Biochemistry of tellurium. **Biol. Trace. Elem. Res.** 55, 231-239, 1996.
- TIANO, L., FEDELI, D., SANTRONI, A.M., VILLARINI, M., ENGMAN, L., FALCIONI, G. Effect of three diaryl tellurides, and an organoselenium compound in trout erythrocytes exposed to oxidative stress in vitro. **Mutat. Res.** 464, 269-277, 2000.
- TIMBRELL, J. Principles of biochemical toxicology, 3rd ed, London: Taylor & Francis, 2000.
- TOEWS, A.D., ROE, E.B., GOODRUM, J.F., BOULDIN, T.W., WEAVER, J., GOINES, N.D., MORELL, P. Tellurium causes dose-dependent coordinate down-regulation of myelin gene expression. **Brain Res. Mol. Brain Res.** 49, 113-119, 1997.

- WAGNER, C., FACHINETTO, R., CORTE, C.L.D., BRITO, V.B., SEVERO, D., DIAS, G.O.C., MOREL, A.F., NOGUEIRA, C.W., ROCHA, J.B.T. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. **Brain Res.** 1007, 192-198, 2006.
- WAGNER-RECIO, M., TOEWS, A.D., MORELL, P. 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, 1994.
- WIESLANDER, E., ENGMAN, L., SVENSJO, E., ERLANSSON, M., JOHANSSON, U., LINDEN, M., ANDERSSON, C.M., BRATTSAND, R. Antioxidative properties of organotellurium compounds in cell systems. **Biochem. Pharmacol.** 55, 573-584, 1998.
- WIRTH, T. Glutathione peroxidase-like activities of oxygen-containing diselenides. **Molec.** 3, 164-166, 1998.
- WITZTUM, J.L. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. **Lancet** 344, 793-795, 1994.
- WÖHLER, F. Liebigs. **Annals of Chemistry** 35, 111, 1840.
- YAREMA, M.C., CURRY, S.C. Acute tellurium toxicity from ingestion of metal-oxidizing solutions. **Pediatrics** 116, 319-321, 2005.
- YERER, M.B., AYDOGAN, S. The in vivo antioxidant effectiveness of alpha tocopherol in oxidative stress induced by sodium nitroprusside in rat red blood cells. **Clin. Hemorheol. Microcirc.** 30, 323-329, 2004.
- YOSHINO, M.; MURAKAMI, K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. **Anal. Biochem.** 257, 40-44, 1998.
- YOU, Y., AHSAN, K., DETTY, M.R. Mechanistic studies of the tellurium(II)/tellurium(IV) redox cycle in thiol peroxidase-like reactions of diorganotellurides in methanol. **J. Am. Chem. Soc.** 125, 4918-4927, 2003.
- ZENI, G., LUDTKE, D.S., PANATIERI, R.B., BRAGA, A.L. Vinylic tellurides: from preparation to their applicability in organic synthesis. **Chem. Rev.** 106, 1032-1076, 2006.
- ZHANG, H., SWIHART, M.T. Synthesis of tellurium dioxide nanoparticles by spray pyrolysis. **Chem. Mater.** 19, 1290-1301, 2007.