

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL – UCS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Complexos derivados do ácido valproico – teratogenicidade embrionária e
atividade anticonvulsivante em *Zebrafish* (*Danio rerio*)

Lauren Dockhorn Grünspan

Caxias do Sul, 2015.

Lauren Dockhorn Grünspan

Complexos derivados do ácido valproico – teratogenicidade embrionária e
atividade anticonvulsivante em *zebrafish* (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade
de Caxias do Sul visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profº Dr Sidnei Moura e Silva

Co-orientador: Dr. Leandro Tasso

Caxias do Sul, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

G891c Grünspan, Lauren Dockhorn, 1986-

Complexos derivados do ácido valproico – teratogenicidade embrionária e atividade anticonvulsivante em zebrafish (Danio rerio) / Lauren Dockhorn Grünspan. – 2015.

77 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva ; Coorientador: Prof. Dr. Leandro Tasso.

1. Ácido valproico. 2. Epilepsia – Tratamento. 3. Princípio ativo (Farmacologia). 4. Toxicologia. 5. Farmacologia. I. Título.

CDU 2. ed.: 615.213

Índice para o catálogo sistemático:

1. Ácido valproico	615.213
2. Epilepsia – Tratamento	616.853
3. Princípio ativo (Farmacologia)	615.015.11
4. Toxicologia	615.9
5. Farmacologia	615

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

LAUREN DOCKHORN GRÜNSPAN

COMPLEXOS DERIVADOS DO ÁCIDO VALPROICO –

TERATOGENICIDADE EMBRIONÁRIA E

ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE EM *Zebrafish* (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Tasso

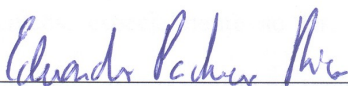
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17 DE DEZEMBRO DE 2015.



Orientador: Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva



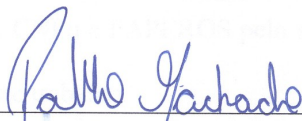
Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Tasso



Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico



Prof. Dr. Lucas Fürstenau de Oliveira



Prof. Dr. Pablo Machado

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva por sua orientação e exemplo profissional, pelo apoio, atenção, confiança a mim conferida no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leandro Tasso, do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da UCS, pela co-orientação.

Ao Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira, do Laboratório de Neurociências Celular e Molecular do Departamento de Bioquímica da UFRGS, pelo inestimável auxílio e ensinamentos na pesquisa com *Zebrafish*.

Aos grandes e queridos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos pelo apoio e ajuda durante a nossa convivência. Agradecimento especial a Dr^a Luciane Minetto, Paulo Roberto dos Santos e Camila Cervi Pires por todo o auxílio e companheirismo.

Às grandes e queridas amigas do Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparação de DNA, em especial a Rafaele Frassini e Prof^a. Dr^a Mariana Roesch Ely por toda a dedicação, ensinamentos e amizade.

Aos colegas do Laboratório 24 do Departamento de Bioquímica da UFRGS pelos ensinamentos técnicos, especialmente ao Dr. Eduardo Rico, M.Sc. Ben Hur Mussulini e Suelen Baggio pelo grande auxílio no transcender das dificuldades.

A todos os colegas e professores dos Laboratórios do Instituto de Biotecnologia que de alguma forma me auxiliaram. Ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia, PPGP/UCS, CNPq e FAPERGS pelo suporte financeiro e concessão de bolsas para a realização deste trabalho.

Sumário

RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVO.....	8
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
4.1 Epilepsia.....	9
4.2 Fármacos usados no tratamento da epilepsia	10
4.3 O Ácido Valproico.....	11
4.4 A importância dos metais em sistemas biológicos	14
4.5. Complexos organometálicos	15
4.6. Modelo Animal para Estudo da Epilepsia	18
4.7. Modelo Animal para Estudo da Teratogênese	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4. DISCUSSÃO GERAL.....	57
5. CONCLUSÕES	63
6. PERSPECTIVAS	64

RESUMO

A epilepsia é uma patologia que afeta 50 milhões de pessoas, sendo que cerca de 30% dos pacientes apresentam epilepsia refratária, ou seja, não respondem a terapia medicamentosa disponível. Portanto, é necessária a busca contínua de novos fármacos. Os complexos organometálicos vêm ao encontro a esta necessidade conjugando moléculas já aplicadas na terapia (como o ácido valproico), a metais essenciais e outros ligantes a fim de aprimorar os efeitos farmacológicos. Neste trabalho foram testados quatro complexos derivados do ácido valproico: $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Fen}]$, $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$, $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Fen}]$ e $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$, através do *screening* toxicológico embrionário e atividade anticonvulsivante em *zebrafish* induzidos por pentilenotetrazol (PTZ). O complexo $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$ apresentou maior toxicidade embrionária ($\text{CL}_{50}=0.12 \mu\text{M}$), seguido pelo $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$ ($\text{CL}_{50} = 10\mu\text{M}$). Estes mesmo complexos nas doses de 10 mM/Kg, 30 mM/Kg e 100 mM/Kg para derivado contendo zinco a intensidade das convulsões em relação ao valproato de sódio (175 mM/Kg) em peixes adultos, demonstrando ação superior ao fármaco tradicional. Devido a baixa toxicidade aliada a ação anticonvulsivante evidente selecionamos o derivado $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$ para estudos futuros em modelos complexos de epilepsia.

ABSTRACT

The most important determinant of quality of life in patients with epilepsy is complete seizure control, and therefore this should be the ultimate goal of pharmacological therapy. Unfortunately, around 30% of epileptic patients still suffer with refractory epilepsy. Metal ions have been frequently incorporated into pharmaceuticals for therapeutic or diagnostic purposes and the research. In this study, we access the embryo toxicity and anticonvulsant activity of 4 novel metallodrugs, with Zn^{+2} and Cu^{+2} , derivative with valproic acid and the *N*-donor ligand in adult *zebrafish* pentylenetetrazole epileptic seizure model. $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ LC_{50} in 48 Hours Post Fertilization (hpf) was 0.22 μM and 0.12 μM in 96 hpf followed by $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ ($\text{LC}_{50} = 10 \mu\text{M}$). This same metallodrugs ($[\text{CuValp})_2\text{Bipi}]$ 10 mM/Kg and $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$ 30 mM and 100 mM/Kg) displayed a superior activity reducing the seizure intensity compared to Sodium Valproate (175 mM/Kg). As conclusion, among all, the $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$ showed the best anticonvulsant effects, but due to its toxic effects on embryos and larvae, the $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$ should be considered the most promising for future studies as anticonvulsant drug.

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é definida como uma alteração na atividade elétrica do cérebro, temporária e reversível provocando manifestações motoras, sensitivas, sensoriais, psíquicas ou neurovegetativas. Pode provocar graves consequências, incluindo ferimentos, problemas psicológicos, transtornos mentais e morte súbita. A presença da doença é definida pela recorrência de crises convulsivas e a sua causa é usualmente uma combinação de predisposição genética e/ou algum tipo de doença ou dano cerebral. (DE, 2005; SANDER, 1996).

A compreensão dos mecanismos de epileptogênese em termos celulares e moleculares consistiu um arcabouço para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Apesar de ainda haver limitações no entendimento etiológico específico das epilepsias, a terapêutica é dirigida para o controle dos sintomas, através da supressão das convulsões pela administração crônica de medicamentos anticonvulsivantes. No entanto, cerca de 30% dos pacientes não respondem ao tratamento com uso de fármacos anticonvulsivantes, mesmo com o aumento de fármacos disponíveis (WHO, 2015). Desta forma, um dos principais objetivos na investigação da epilepsia tem sido o desenvolvimento de novas substâncias anticonvulsivantes com maior eficácia e menor toxicidade (LÖSCHER; SCHMIDT, 2002).

O ácido valproico (ácido 2-propil-pentanoico) ainda é o fármaco de escolha para o tratamento e prevenção de crises convulsivas, além de ser indicado para tratamento de outras patologias como enxaqueca, dor neuropática, mioclonia pós-hipóxia e transtorno bipolar (BRANDT et al., 2006; CHATEAUVIEUX et al., 2010; PERUCCA, 2002). Entretanto, este fármaco causa uma série de efeitos adversos, sendo os principais

diretamente relacionados ao uso crônico, como o ganho de peso, hepatotoxicidade, hiperamonemia, trombocitopenia, pancreatite e teratogenicidade (BELCASTRO, et al., 2013). Na maioria dos casos, os efeitos colaterais são diretamente proporcionais à dose administrada. Para este medicamento, os efeitos tóxicos ocorrem em concentrações superiores a 60 mg/kg/dia (BRUNTON, 2012).

Novas moléculas ativas para tratar patologias humanas são na maioria dos casos estruturas orgânicas, sendo somente uma pequena parcela é de origem inorgânica ou apresenta metais de transição em sua composição (SPRECKELMEYER; ORVIG; CASINI, 2014). No entanto, o mecanismo de ação de algumas moléculas orgânicas ativas pode envolver a coordenação com metais *in vivo*, promovendo a formação de complexos organometálicos (TUREL, 2015). Estes complexos podem proporcionar atividades intra e extracelular, como um exemplo, as metaloproteínas, as quais apresentam um ou mais íons metálicos com funções específicas. Algumas reações a como as de oxidação-redução do ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu) e molibdênio (Mo); reações de rearranjo radicalar com complexos de zinco (Zn), magnésio (Mg), níquel (Ni); e atuação como ácidos de Lewis e complexantes são as atividades mais comuns dos metais em sistemas biológicos (ATKINS, 2003).

Um grande número de compostos é avaliado quando se busca novas substâncias químicas para uso terapêutico. Nas etapas pré-clínicas, estas moléculas são testadas em diversos modelos animais. Estes devem apresentar as seguintes características: fácil de executar, em pouco tempo e com baixo custo, além de ser preditivo para atividade desejada (LÖSCHER, 2011a; ROGAWSKI; LÖSCHER, 2004). O modelo de avaliação da atividade antoconvulsivante em *zebrafish* (*Danio rerio*) vem ao encontro a estes requisitos, ademais outra vantagem que este modelo animal apresenta é o desenvolvimento embrionário *ex utero* sendo um ótimo modelo para a avaliação da

toxicidade embrionária uma vez que o principal efeito adverso dos fármacos anticonvulsivantes é a teratogênese (SELDERSLAGHS et al., 2009).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi a busca de novas moléculas ativas contra epilepsia, na forma de organocomplexos inorgânicos contendo ácido valproico como ligante. Além disso, foi avaliada a toxicidade embrionária com objetivo de indicar o quão seguro são estes compostos. Ambos os testes foram realizados com quatro complexos organometálicos derivados do ácido valproico em modelo de *zebrafish* (*Danio rerio*).

2. OBJETIVO

Buscar novas moléculas ativas contra epilepsia, na forma de organocomplexos inorgânicos contendo ácido valproico como ligante.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos anticonvulsivantes dos complexos organometálicos derivados do ácido valproico em modelo agudo de epilepsia em *Zebrafish*;
- Determinar qual complexo organometálico apresenta o melhor perfil anticonvulsivante;
- Avaliar os possíveis efeitos teratogênicos dos complexos organometálicos derivados do ácido valproico em embriões de *Zebrafish*;
- Determinar a concentração letal dos complexos organometálicos em embriões de *Zebrafish*.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Epilepsia

As epilepsias são distúrbios comuns e frequentemente devastadores, que afetam cerca de 50 milhões de pessoas mundialmente. No entanto, dentre estes pacientes 30% apresentam crises refratárias (sem resposta) ao tratamento medicamentoso (BEGHI, 2004; WHO, 2015). Conforme a Organização Mundial da Saúde (2015), a proporção estimada de pessoas com epilepsia ativa (convulsões contínuas ou a necessidade de tratamento) num dado momento está entre 0,4% a 1,0%. Já em países em desenvolvimento estima-se que este número seja maior e esteja entre 0,6 a 1,0% de casos. As principais causas para o aumento dos casos em países subdesenvolvidos estão atribuídas ao aumento do risco de condições endêmicas como a malária ou neurocisticercose, a maior incidência de acidentes de trânsito, além de lesões relacionadas ao nascimento. Outras causas são as variações na infraestrutura médica, a disponibilidade de programas de saúde preventiva e cuidados acessíveis (WHO, 2015).

Esta doença crônica, tem como sintomas uma atividade neuronal excessiva. As convulsões são breves episódios de tremores involuntários que podem envolver uma parte (parcial) ou total (generalizada) do corpo. Por vezes, estas vêm acompanhadas de perda de consciência e do controle intestinal ou urinário. Elas podem ainda variar em relação a lapsos breves de atenção ou musculares, para convulsões graves e prolongadas. Podem ainda ter frequências variadas, de menos de um por ano para várias vezes por dia (BRUNTON, 2012; WHO, 2015).

As manifestações excessivas e/ou hipersincrônicas, autolimitadas ou não, de neurônios cerebrais da atividade epilética resultam em crise epilética. Quando estas crises não apresentam curso autolimitado são denominadas crises contínuas, configurando o quadro de estado epilético (ENGEL, 2006). As crises epiléticas

parecem originar-se do córtex cerebral, mas não de outras estruturas do sistema nervoso central (SNC) como tálamo, tronco encefálico ou cerebelo. A Commission on Classification and Terminology (2009) classificou as crises epilépticas como parciais, quando começam focalmente em uma área do córtex, ou generalizadas, quando envolvem os dois hemisférios de forma difusa e simultânea. Estas últimas são normalmente associadas com anormalidades estruturais do cérebro. As convulsões generalizadas envolvem simultaneamente regiões cerebrais difusas e podem ser um resultado de anormalidades celulares, bioquímicas ou estruturais com ampla distribuição (HARRISON, 2010). As manifestações de uma crise epiléptica são determinadas pelas funções normalmente desempenhadas pela área cortical que a originou, por exemplo, uma crise envolvendo o córtex motor está associada aos abalos clônicos da parte corporal da controlada por aquela região cortical (BRUNTON, 2012).

4.2 Fármacos usados no tratamento da epilepsia

Historicamente, os fármacos antiepilépticos podem ser classificados em 3 gerações. A primeira geração foi comercializada entre 1857 a 1958, incluindo o brometo de potássio, fenobarbital e uma variedade de fármacos que foram derivados principalmente de modificações estruturais de barbitúricos, incluindo a fenitoína, primidona, trimetadiona e etoximidina.(SHORVON, 2009).

A segunda geração de fármacos antiepilépticos inclui a carbamazepina, valproato de sódio e benzodiazepínicos, os quais foram introduzidos entre 1960 a 1975 (LÖSCHER; SCHMIDT, 2011).

Entretanto, estes fármacos apresentam desvantagens farmacocinéticas, efeitos teratogênicos iminentes e potenciais para causar danos cognitivos. Apesar destas desvantagens, algumas destas substâncias ativas continuam sendo utilizadas como primeira escolha para o tratamento das crises epilépticas (BEGHI, 2004).

O desenvolvimento de novos fármacos, a terceira geração (vigabatrina, felbamato, gabapentina, lamotrigina, topiramato, tiagabina, oxcarbazepina, levetiracetam, zonasamida e pregabalina) aumentaram as opções terapêuticas especialmente para os pacientes resistentes aos medicamentos mais antigos. Estas novas substâncias são melhores toleradas, apresentando menores interações farmacológicas e paracem afetar, em menor grau, as funções cognitivas (BEGHI, 2004). Apesar destas vantagens, fármacos como ácido valproico e carbamazepina são mais eficazes em casos de epilepsia generalizada e focal (LÖSCHER; SCHMIDT, 2011).

De modo geral, os fármacos antiepiléticos agem principalmente através do bloqueio inicial ou da propagação das convulsões, as quais ocorrem através de diferentes mecanismos que alteram a atividade dos canais iônicos ou neurotransmissores. As principais vias de ação elucidadas até os dias atuais incluem a inibição do potencial de ação Na^+ -dependente da frequência, ou seja, são moduladores do canal de sódio voltagem-dependente; bloqueadores do canal de cálcio (Ca^{2+}); reguladores da liberação de glutamato; moduladores alostéricos do receptor GABA; e inibidores da captação do GABA/inibidores da GABA-transaminase. Podem ainda serem antagonistas do receptor de NMDA do AMPA (ALI; KHAN; SIDDIQUI, 2015; BRUNTON, 2012; MARIA; SIQUEIRA, 2011).

No entanto, as drogas atualmente usadas na terapêutica são capazes de controlar entre 70% a 80% dos casos. Desta forma, existe uma necessidade vigente de novas entidades eficazes e seguras (MARIA; SIQUEIRA, 2011).

4.3 O Ácido Valproico

O ácido valproico (AV) (ácido 2-propilvalérico, 2-propilpentanóico ou *n*-propilacético) (Figura 1) é um derivado do ácido valérico. Esta substância produzida naturalmente pela valeriana (*Valeriana officinalis*) foi sintetizada pela primeira vez em

1882 por Burton (BURTON, 1882). Este é caracterizado como um ácido carboxílico de cadeia curta, que a temperatura ambiente se comporta como um líquido incolor. Pelas suas características físico-químicas, foi muitas vezes usado como solvente de compostos orgânicos e tratado como “fisiologicamente inerte”. No entanto, em um estudo realizado na década de 60 com moléculas potencialmente antiepiléticas dissolvidas em AV, observou-se que o solvente (AV) era o que possuía a atividade. Neste estudo o “solvente” protegeu roedores de convulsões induzidas por pentilenotetrazol. (Morceau, Chateauvieux, Dicato, & Diederich, 2010).

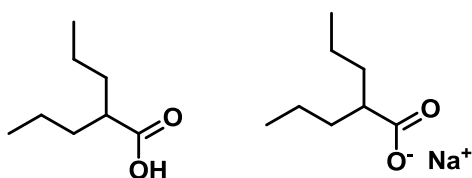


Figura 1. Estruturas químicas do ácido valproico e valproato de sódio

A dose inicial de AV é de 10 a 15 mg/Kg e deve ser aumentada, semanalmente, entre 5 a 10 mg/Kg até o controle das crises convulsivas. Entretanto, deve-se ressaltar que a dose máxima de 60/mg/kg.dia deve ser respeitada uma vez que a relação com os efeitos adversos é proporcional (ABBOTT LABORATORIES, 2013).

O principal alvo do AV são as sinapses GABAérgicas através do aumento da síntese de GABA o que dificulta o seu metabolismo por inibir várias enzimas relacionadas com o ciclo do ácido tricarboxílico modulando a sinalização das vias intracelulares (Landmark, 2007). Além disso, foi comprovado que o AV inibe o metabolismo energético através da inibição enzimática, o que pode modular a excitação neuronal. Portanto, pode-se dizer que os principais alvos terapêuticos do AV são as sinapses GABAérgicas, metabolismo energético e canais iônicos (Wu *et al*, 2010). No entanto, o problema deste farmaco reside na alta variabilidade da relação entre dose e

concentrações plasmáticas alcançadas em diferentes pacientes. Isto pode conduzir a um aumento da dose, aumentando por consequência os efeitos adversos severos como hepatotoxicidade (encefalopatia hepática, falência hepática e hiperamonemia), distúrbios hematológicos (hipocoagulação e complicações hemorrágicas) e teratogênese (CHATEAUVIEUX et al., 2010; NANAU; NEUMAN, 2013). Este último é o efeito colateral com maior severidade (TOMSON et al., 2015).

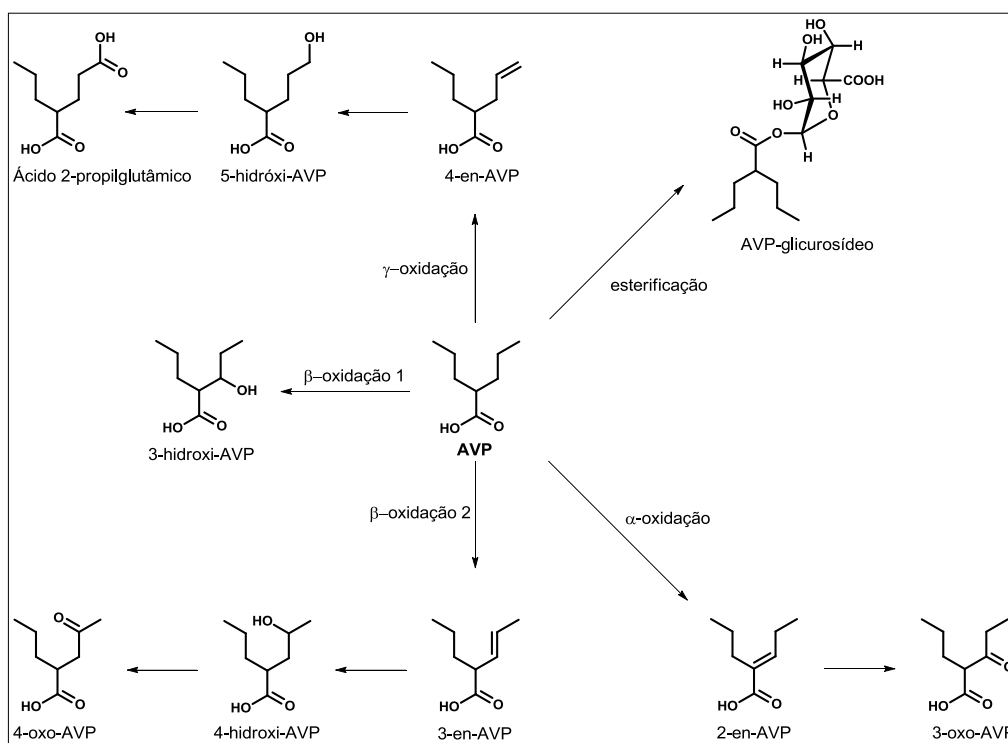


Figura 2. Principais rotas de biotransformação do ácido valproico.

Fonte: Adaptado de NURGE et al., 1991 e BELLO-RAMÍREZ et al., 2002.

O AV é rapidamente biotransformado no fígado (12 metabólitos identificados em humanos e 16 em roedores), (LÖSCHER; DAGMAR, 1996). Por suas características hidrofílicas (Figura 2), tanto o AV como seus principais metabólitos são majoritariamente excretados pela urina. No entanto, dois metabólitos (4-eno-valproato e 2,4-dieno-valproato) são produzidos pelo complexo citocromo P-450 e são potencialmente hepatotóxicos (CHAPMAN et al., 1982; LÖSCHER; DAGMAR, 1996).

4.4 A importância dos metais em sistemas biológicos

O bom funcionamento de organismos vivos depende de metais como o cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e molibdênio (Mo), sendo estes conhecidos como essenciais (MIRANDA et al., 2000). A importância destes pode ser medida pelo papeis fundamentais na estabilização de proteínas e fatores de transcrição; como cofatores de metalochaperonas (proteínas chave para o transporte seguro de íons metálicos dentro das células) para o transporte celular; e em diversos processos de catálise enzimática (BUTTERWORTH, 2010; MARKOSSIAN; KURGANOV, 2003).

Um exemplo disto é o cobre, este metal é indispensável para o desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso central (SNC). As concentrações de cobre no cérebro adulto podem variar de 2,9 a 10,7 mgCu/g e dependem da região cerebral onde se encontram refletindo em diferenças no metabolismo do metal (LINDER et al., 1999; LUTSENKO; BHATTACHARJEE; HUBBARD, 2010). É também necessário como cofator para diversas enzimas envolvidas em processos vitais do SNC, como a respiração, síntese de neurotransmissores, ativação de neuropeptídeos e hormônios, proteção contra o estresse oxidativo, mielinização, pigmentação e metabolismo do ferro, entre outros (LUTSENKO, 2010).

Outro exemplo é o zinco, elemento essencial sendo requerido em uma extensa gama de funções metabólicas (KING, 2011). O cérebro apresenta as maiores concentrações de zinco em relação aos outros órgãos, por volta de 100 a 150 μ M. Aproximadamente 90% do zinco presente no cérebro está ligado a metaloproteínas, e os 10% restantes são encontrados nas vesículas pré-sinápticas ou livres (FREDERICKSON; KOH; BUSH, 2005; MATHIE et al., 2006) Estudos recentes sugerem que a mudança a nível celular nas concentrações de Zn, está correlacionada com o equilíbrio deste elemento, incluindo alterações nos *pools* celulares facilitados

pelos transportadores de Zn e por proteínas de ligação. (CROXFORD; MCCORMICK; KELLEHER, 2011; SONG et al., 2010). Geralmente, este metal é essencial para o metabolismo normal revelando sua natureza ubíqua e altas concentrações celulares, sendo essencial em três funções básicas: catalítica, estrutural e reguladora (HOLLAND et al., 2015).

Por outro lado, níveis extracelulares elevados de cobre e zinco no cérebro podem resultar em neurotoxicidade. Os níveis extracelulares de cobre tendem a aumentar com o envelhecimento e na presença de doenças neurodegenerativas. A habilidade do cobre em realizar o ciclo redox (redução-oxidação) para ativar o oxigênio é utilizada por uma variedade de enzimas (superóxido dismutase, SOD) sendo este o papel mais importante do metal no organismo (MATHIE et al., 2006).

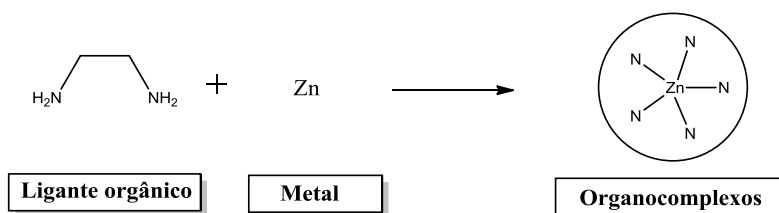
Apesar de não apresentar um perfil redox tão reativo quanto o cobre, o zinco também é necessário para a ação antioxidante principalmente durante o reparo de DNA. O zinco é um componente estrutural e funcional de diferentes enzimas e fatores de transcrição envolvidos na manutenção da resposta antioxidante e integridade do DNA. Níveis inadequados de zinco no cérebro resultam no funcionamento anormal da SOD quando estes níveis estão aumentados (zinco livre) há neurotoxicidade. Entretanto, cabe ressaltar que concentrações elevadas de zinco podem ser tanto neurotóxicas ou neuroprotetoras dependendo do tipo de neurônio que se encontram (FREDERICKSON; KOH; BUSH, 2005; MATHIE et al., 2006).

4.5. Complexos organometálicos

A história nos mostra que fármacos e remédios com bases metálicas têm sido utilizados desde os primórdios da humanidade. Um exemplo disso é a prata (Ag), a qual foi usada para o tratamento de feridas e úlceras na medicina grega por Hipócrates. No

entanto, as propriedades antimicrobianas deste metal já eram conhecidas bem antes desta época. Os egípcios sabiam como esterilizar água com cobre, pois utilizavam frascos feitos com o metal para armazenar líquidos puros, já os chineses utilizavam o ouro na medicina em 2500 A.c. (MEDICI et al., 2015).

Os complexos metálicos consistem em um átomo central metálico ou íon chamado de centro de coordenação o qual é envolvido por íons ou moléculas, chamadas de ligantes. As possibilidades de combinações metais-ligantes são muito grandes utilizando principalmente os seguintes metais: ferro, níquel, cobre, zinco, tecnécio, rutênio, ródio, platina e ouro. Entre os ligantes, os principais são os nitrogenados e oxigenados, bi- e mono- dentados, Esquema 1 (TUREL, 2015).



Esquema 1. Organocomplexos a partir de fármacos.

A primeira molécula organometálica utilizada como fármaco foi a salvarsan, um agente antimicrobiano derivado do arsênico desenvolvido por Paul Ehrlich em 1912, utilizado para o tratamento da sífilis (Ehrlich, 1912). Na sequência foi descoberto por acaso o Platinol, em 1965 por Rosenberg e VanCamp, o qual teve seu uso clínico aprovado pelo FDA em 1978 (MEDICI et al., 2015). Estes casos de sucesso alavancaram o desenvolvimento de diferentes organocomplexos, sendo a cisplatina é um produto desta evolução. Esta tem sido amplamente utilizada como agente antitumoral (CASINI; MESSORI, 2011). Infelizmente, a cisplatina não é o fármaco ideal e possui várias desvantagens. Dentre elas, a sua baixa seletividade por células não

tumorais e a grande resistência tumoral adquirida após o primeiro tratamento, além dos efeitos colaterais como: náuseas, vômitos, insensibilidade nas extremidades do corpo, supressão medular e nefrotoxicidade (DABROWIAK, 2009).

Entre os metais, o rutênio (Ru) se destaca na pesquisa de agentes terapêuticos organometálicos. A grande maioria dos trabalhos científicos são dedicados a síntese de complexos contendo Ru(II) e Ru(III) com potencial atividade anticâncer. Embora menos eficazes que a cisplatina, estes compostos apresentam menos efeitos adversos. Outro foco também é a atividade antibiótica, antimalárica e antiviral de complexos com este metal (DABROWIAK, 2009). Entre os estudos recentes, cabe destacar os complexos dinucleares de Ru(II) e 1,10-fenantrolina, os quais foram avaliados contra *S. aureus* (resistente a metilicina), *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos foram surpreendentes, pois o organometálico apresentou atividade bactericida entre 2 a 6 horas de exposição (LI et al., 2012). Do mesmo modo, outros organocomplexos com este metal foram eficazes contra promastigotas e amastigotas *Leishmania major* e no tratamento de *M. Tuberculosis*, sendo a sua atividade 150 vezes maior que o fármaco de referência (MELO PEREIRA et al., 2010; PAVAN et al., 2011, 2013).

Moléculas organometálicas com Cobre vêm sendo amplamente investigados com propósitos diversos: como antimalárico, antifúngico, antibacteriano, anti-inflamatório (artrite reumatoide) cicatrizante, e hipoglicêmico (KOWOL et al., 2012). Outro campo de estudo está no tratamento de patologias neurológicas como Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e Alzheimer devido ao seu potencial neuroprotetor (MEDICI et al., 2015).

Até então, não existe nenhum medicamento organometálico usado no tratamento de epilepsia. No entanto, novas entidades complexas do ácido valproico com íons de

cobre divalente apresentaram efeitos terapêuticos muito superiores ao composto parental . Em estudo realizado por Sylla-Iyarreta *et al* (2009), o composto bis-valproato (1,10-fenantrolina) cobre (II) foi efetivo na prevenção de convulsões clônicas mínimas (DE₅₀ 8 µMol/Kg) apresentaram atividade anticonvulsivante frente ao modelo de eletrochoque máximo (MES) (SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009b).

Em trabalho similar, Santos (2015) demonstrou a síntese de derivados do ácido valproico com Zn, além de 2,2 – bipyridina e fenantrolina como ligantes auxiliares. Estes compostos foram avaliados quanto a sua toxicidade em modelo de *Artemia salina*, apresentando uma um valor de DL₅₀= 409 µg/mL superior ao do AV (1000 µg/mL) (SANTOS, 2015).

4.6. Modelo Animal para Estudo da Epilepsia

As epilepsias humanas abrangem uma grande variedade de manifestações clínicas, comportamentais e elétricas. A investigação desta patologia tem uma longa história de estudos comparativos anatômicos e fisiológicos em uma variedade de espécies animais, principalmente de mamíferos (LÖSCHER, 2011b). No entanto, um número relativamente limitado de modelos utilizando roedores tem emergido como principais escolhas para a maioria das investigações (GRONE; BARABAN, 2015).

Como todos os modelos de doenças, esses animais devem ser capazes de recapitular o mecanismo causal subjacente à doença em humanos (validade do construto), as características fenotípicas da condição humana (validade aparente) e as respostas ao tratamento clínico (validade preditiva). Hipoteticamente, o modelo perfeito contemplaria os três critérios, ou seja, apresentaria etiologia semelhante com a forma humana, exibiria os mesmo fenótipos fisiológicos, comportamentais ou genéticos, e

responderiam às mesmas terapias (AVANZINI, 1995; BAUSH, 2009; WILLNER, 1991).

Um dos métodos utilizados para investigar as convulsões epiléticas em modelos animais consiste em analisar o perfil comportamental através da classificação escore dos estágios epiléticos (ROSEMBERG et al., 2011; SARKISIAN, 2001). A caracterização de convulsões induzidas por *kindling* elétrico é bem estabelecida em roedores (RACINE, 1972) e para substâncias quimio convulsivantes como o kainato (KA), pilocarpina e pentilenotetrazol (PTZ) (SIERRA et al., 2012). A exposição ao PTZ induz uma sequência de comportamentos estereotipados os quais iniciam com movimentos orofaciais e finalizam em convulsões clônicas em roedores. Este modelo tem sido amplamente utilizado nas ultimas 6 décadas (LÖSCHER; SCHMIDT, 2011; SHORVON, 2009). No entanto além de terem um elevado custo, também demandam muito tempo. Ademais existe uma crescente exigência da sociedade pela diminuição do uso de animais (mamíferos) de laboratório (LÖSCHER; SCHMIDT, 2011).

Neste contexto, o *zebrafish* emerge como um novo modelo animal para avaliar os efeitos clássicos de substâncias pró convulsivantes no desenvolvimento e caracterização de novos candidatos a fármacos (BERGHMANS et al., 2007; INGHAM, 2009; KARI; RODECK; DICKER, 2007). Esta espécie apresenta diversas semelhanças e grande homologia genética com ratos e humanos (BARBAZUK et al., 2000; RICO et al., 2010).

O cérebro do *zebrafish* apresenta as principais subdivisões: tectum óptico, a maior estrutura do mesencéfalo do *zebrafish*. A organização ‘cortical’ inicia em 5 dpf, apresentando neurônios glutamatérgicos excitatórios, interneurônios inibitórios GABAérgicos e astrócitos. Dados da gravação da atividade extracelular do tectum

óptico (Figura 3) em larvas imobilizadas de *zebrafish* mostraram atividade interictal interrompida por uma grande amplitude e com múltiplos picos caracterizando descargas ictais (HORTOPAN; DINDAY; BARABAN, 2010).

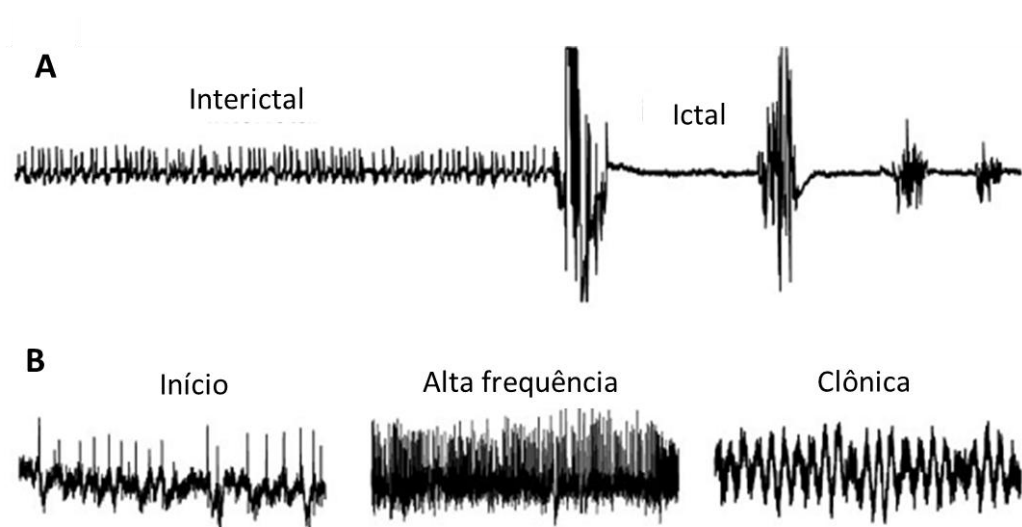


Figura 3. Atividade da convulsão aguda em *zebrafish*. (A) Gravações obtidas a partir da tectum óptico de larvas de *zebrafish* (7-dpf) expostas a 15mM PTZ. Nota-se a presença de pequenas-amplitudes rápidas denotando atividade interictal, seguido por sequência de surto-supressão marcada pela ocorrência de picos múltiplos e grande amplitude de 'estável' - como atividade. (B) Gravações unitárias representativas obtidas a partir de uma célula individual no tectum óptico de larvas de *zebrafish* (7 dpf) expostos a 15mM PTZ. Observe a presença inicial de disparo com aumento atividade (início), seguida de disparo de alta frequência e um período de atividade clônica.

Fonte: Adaptado de HORTOPAN et al., 2010.

Convulsões induzidas em *zebrafish* utilizando 4-aminopiridina e pentilenotetrazol ou calor se assemelham às convulsões induzidas em mamíferos. De fato, uma análise matemática dos eventos elétricos em camundongos, *zebrafish* e

humanos concluíram que as regras básicas de iniciação e termino da atividade elétrica são universais (BARABAN et al., 2005; HUNT et al., 2012; JIRSA et al., 2014).

Em estudo realizado por Hortopan (2010), onde larvas de *zebrafish* foram expostas ao PTZ pode-se observar um aumento no disparo celular no início da convulsão, o qual é seguido pelo aumento da frequência e por ondas de atividade ‘clônica’. Estes resultados demonstram uma grande similaridade aos resultados obtidos no modelo de convulsão aguda no córtex de macacos (Schmidt, 1959) ou em regiões identificadas como epiléticas em humanos (CALVIN; OJEMANN; WARD, 1973; HORTOPAN; DINDAY; BARABAN, 2010; WYLER; OJEMANN; WARD, 1982).

Ademais, o *zebrafish* apresenta uma barreira estreita entre a junção sangue-cérebro sendo extremamente similar a barreira hematencefálica dos vertebrados superiores, com alta permeabilidade de macromoléculas, o qual transforma este modelo animal um organismo atrativo para realizar o *high throughput screening* na descoberta de novos fármacos antiepiléticos (Figura 4) (ELICEIRI; GONZALEZ; BAIRD, 2011; JEONG et al., 2008).

4.7. Modelo Animal para Estudo da Teratogênese

A exposição uterina a fármacos antiepiléticos é associada à malformação congênita severa e a implicações cognitivas adversas na prole de mulheres com epilepsia (EADIE, 2008; HARDEN, 2008). Quando se trata de novas DAE o conhecimento acerca deste assunto é ainda mais limitado (TOMSON; BATTINO, 2012).

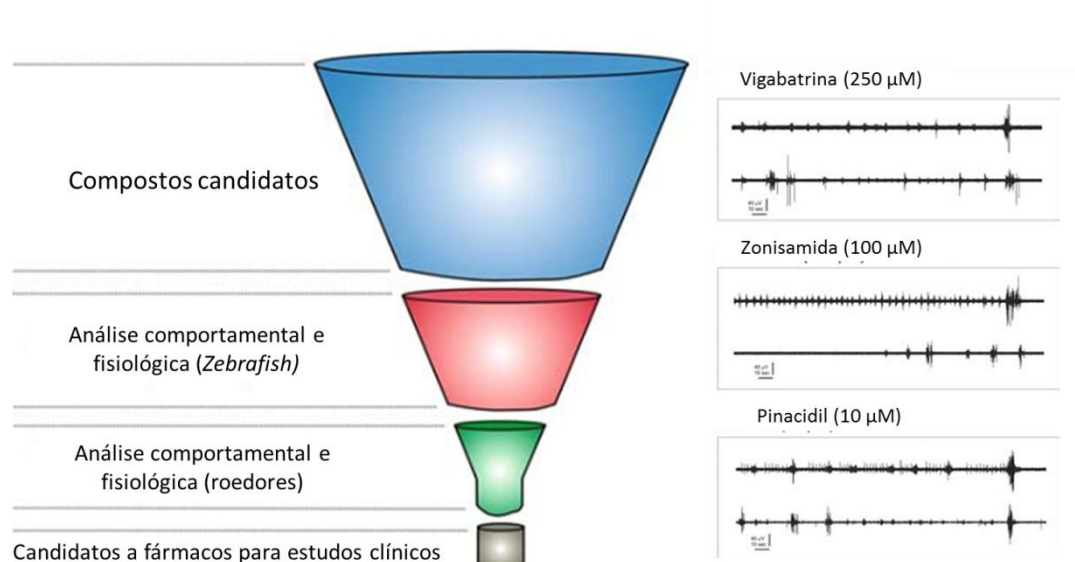


Figura 4. Estratégia de seleção de substâncias anticonvulsivantes em *zebrafish*.

Diagrama esquemático mostrando os passos que poderiam ser tomados para incorporar o *zebrafish* como um filtro de ‘primeira passagem’ com alta produtividade, em um esforço para identificar novas drogas anticonvulsivantes. Em cada etapa desse processo pode-se reduzir o número de potenciais compostos. À direita estão as gravações eletrofisiológicas de *zebrafish* expostos ao PTZ (primeira linha), mostrando o desenvolvimento de um nível estável de atividade eletrográfica da convulsão e o efeito dos fármacos anticonvulsivantes AED (segunda linha).

Fonte: Adaptado de BAUSH, 2009.

Os estudos pré-clínicos em toxicologia incluem testes de teratogenicidade em pelo menos duas espécies (roedor e não roedor). Entretanto, este tipo de teste é geralmente caro além de demandar tempo (BRANNEN et al., 2010). Portanto, há uma necessidade emergente de desenvolver testes para avaliação e predição do potencial teratogênico de candidatos a fármacos, o qual deve ter uma boa relação custo-benefício, produtividade adequada, ensaio de simples conduta, reprodutibilidade e concordância

com os dados *in vivo* em mamíferos (BRANNEN et al., 2010; TON; LIN; WILLETT, 2006)

A popularidade do *zebrafish* como modelo animal vem aumentando nos últimos anos devido à conservação de genes com humanos, e a presença de algumas semelhanças no processo de algumas patologias (LAM et al., 2006; LIESCHKE; CURRIE, 2010). Ademais, este modelo proporciona diversas vantagens práticas (tamanho pequeno, transparência, morfogênese bem descrita), sendo amplamente utilizado na área biológica devido à facilidade de manipulação *in ovo* e fácil monitoramento durante o desenvolvimento morfológico (VAN DER LAAN et al., 2012).

Outro ponto importante está no custo, sendo mais barato de manter quando comparado aos outros modelos animais disponíveis (por exemplo, ratos). O número de embriões obtidos por desova varia de 100 a 200 ovos por casal de peixes e podem sobreviver por até 7 dias em um único poço de placas de 24, 96 ou 360 poços devido ao estoque de nutrientes armazenados no saco vitelínico (MCGRATH; LI, 2008).

A administração de drogas é simples, pois as larvas de *zebrafish* absorvem pequenas moléculas diluídas no meio, na água através da pele e guelras. Após 72 horas pós-fertilização (hpf) os embriões já estão completamente formados. Substâncias de alto peso molecular e hidrofóbicas podem ser injetadas diretamente no saco vitelínico, no sinus venoso ou na circulação (HE et al., 2014). Em estudo realizado por Brannen (2010), o modelo *zebrafish* foi capaz de discriminar substâncias teratogênicas e não teratogênicas, apresentando 87% de concordância com os resultados obtidos em mamíferos e, 15% e 11% em resultados falsos positivos e falsos negativos respectivamente (BRANNEN et al., 2010). A concordância entre embriões de *zebrafish*

e mamíferos em modelos de toxicidade no desenvolvimento embrionário varia entre 64% a 100% (SIPES; PADILLA; KNUDSEN, 2011).

Embora os ensaios convencionais *in vitro* (cultura celular) serem utilizados para avaliar o possível efeito tóxico de candidatos a fármacos e substâncias em geral, este tipo de teste não é preditivo para resultados *in vivo*, pois não contemplam a disposição (absorção, distribuição, metabolização e excreção) das substâncias no organismo completo (MCGRATH; LI, 2008). Portanto, uso do *zebrafish* serve para agilizar a linha de tempo na pesquisa de novos candidatos a fármacos, além de possibilitar a redução do número de mamíferos em etapas pré-clínicas posteriores. (TON; LIN; WILLETT, 2006).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este item está apresentado na forma de artigo científico a ser submetido a revista *Neuropharmacology*.

EMBRIONIC TERATOGENIC AND ANTICONVULSANT EFFECT OF ZINC AND COPPER VALPROATE COMPLEX IN ADULT ZEBRAFISH PENTYLENETETRAZOLE EPILEPTIC SEIZURE MODEL

Running Title: TERATOGENIC AND ANTISEIZURE EFFECT OF VALPROATE ORGANOMETALLIC COMPLEX.

Lauren Dockhorn Grünspan¹, MSc. Ben Hur Marins Mussulini², Suelen Baggio², Paulo Roberto dos Santos¹, PhD. Françoise Dumas³, Dr. Diogo Losh de Oliveira^{*2}, Dr. Sidnei Moura^{*1}

¹*Laboratory of Natural and Synthetics Products, University of Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS, Brazil*

²*Laboratório de Neurociências Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, Porto Alegre, RS, Brazil*

³*Laboratoire BioCIS, CNRS UMR 8076, IPSIT and LabEx LERMIT, Université Paris Sud, Faculté de Pharmacie, 92296 Châtenay-Malabry Cedex, France.*

***Correspondence:**

Prof. Dr. *Sidnei Moura*, Technology Department, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, 1130 Francisco Getúlio Vargas st. CEP 95070-560, Caxias do Sul, Brazil. Phone: + 55 54 3218 2100 ex. 2668 E-mail: sidnei.moura@ucs.br

Prof. Dr. *Diogo Losh de Oliveira*, Laboratório de Neurociências Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, 2600 – Anexo Ramiro Barcelos st., CEP 90035-003, Porto Alegre, Brazil. Phone: + 55 51 3308 5555 ex. 5556 E-mail: losch@ufrgs.br

ABSTRACT

Valproic acid (VPA) is currently the AntiEpileptic Drug (AED) with the broadest spectrum across all types of seizures and epileptic syndromes. Unfortunately, around 30% of epileptic patients still suffer with refractory epilepsy. Metal ions have been frequently incorporated into pharmaceuticals for therapeutic or diagnostic purposes and the research. In this study, we access the embryo toxicity and the anticonvulsant activity of 4 novel metallodrugs, with Zn^{+2} and Cu^{+2} , derivative with valproic acid and the *N*-donor ligand in adult zebrafish pentylenetetrazole epileptic seizure model. The most toxic complex were $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ LC_{50} in 48 Hours Post Fertilization (hpf) was 0.22 μM and 0.12 μM in 96 hpf followed by $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ ($\text{LC}_{50} = 10 \mu\text{M}$). This same metallodrugs ($[\text{CuValp})_2\text{Bipy}]$ 10 mM/Kg and $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ 30 mM and 100 mM/Kg) displayed a superior activity reducing the seizure intensity compared to Sodium Valproate (175 mM/Kg) about 20 times more. As conclusion, among all, the $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ showed the best anticonvulsant effects, but due to its toxic effects on embryos and larvae, the $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ should be considered the most promising for future studies as anticonvulsant drug.

Keywords: Valproate Complex; Zebrafish; Teratogenic; Anticonvulsant; Pentylenetetrazole.

1. Introduction

Valproic acid (VPA) is an AntiEpileptic Drug (AED) with the broadest spectrum across all types of seizures and epileptic syndromes (BELCASTRO & STRIANO, 2012; BELCASTRO et al., 2013). Unfortunately, around 30% of epileptic patients still suffering with refractory epilepsy (LANGER et al., 2011). The lack of novel AED characterizes a challenge, demanding screen of new compounds, which, in many cases, means alteration of classical AED, such as VPA, in order to increase its efficacy. This emphasize the growing importance of further innovative research using experimental models of epileptic seizure (GRONE; BARABAN, 2015).

The metal ions are fundamental components and play important part in life process by serving as essential cofactors, fulfilling cellular functions that cannot be achieve by organic molecules (THOMPSON & ORVIG, 2003; KELLAND, 2007; MJOS & ORVIG, 2014). These have often been incorporated into pharmaceuticals for therapeutic purposes (BARRY & SADLER, 2013; LEMIRE et al., 2013). An important factor is the choice of metal ions with different oxidation states and coordination environments, which may render new metallodrugs with a different spectrum of activity, as for instance, anticancer, antiepileptic activities (ZHAO et al., 2014), treatment of Alzheimer's disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), diabetes, inflammatory states, and cardiovascular diseases (CHOHAN; SUPURAN, 2005; MEDICI et al., 2015).

Until nowadays, there is no organometallic drug used to epilepsy treat. However, new complex entities of valproic acid with divalent copper ions showed therapeutic effects much higher than the reference drug (SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009a). In this study, the valproate compound bis(1,10-phenanthroline)copper (II) was effective in preventing minimal clonic convulsions (ED_{50} 8 mM/Kg) and the

compound bis(1,10-phenanthroline)copper (II) showed anticonvulsant activity against Maximal Electroshock Model (MEM) (SYLLA-IYARRETA VEITÍA et al., 2009a). Santos (2015), demonstrated the synthesis of derivatives of valproic acid with Zn, 2,2 - bipyridine and phenanthroline as ligands. These compounds were evaluated for their toxicity to Brine Shrimp Model (BSM), showing $LD_{50} = 409 \mu\text{g/mL}$.

Addressing the need for novel experimental models in the search of new AED, zebrafish offer a reasonable compromise between physiological complexity and throughput results. Berghmans (2007) has shown in previously work, that zebrafish model can be used for screening of a wide range of anticonvulsants, offering potential advantages in comparison with mice e.g. Embryos of zebrafish have been employed for toxicological studies due to their sensitivity to environmental changes, and physiological characteristics with other vertebrates (PAMANJI et al., 2015). The lack of systematic approach to study metal compound toxicity, as well as the generally structural information on membrane transporters, prevent the understanding of the complex mechanism of drug absorption and excretion, particularly in medicinal inorganic chemistry (SPRECKELMEYER et al., 2014). Zebrafish (*Danio rerio*) is a vertebrate genetic model organism with tremendous potential for modeling acute seizures and genetic epilepsies. Physiologically and behaviorally, acute seizures induced in wild-type zebrafish by 4-aminopyridine and pentylenetetrazole or heat closely resemble those induced in mammals (BARABAN et al., 2005; HUNT et al., 2012).

Indeed, a recent mathematical analysis of electrical seizure events in mice, zebrafish and humans concluded that the underlying rules governing initiation and termination were universal (JIRSA et al., 2014).

Thus, in this study, we assess the embryo toxicity and the anticonvulsant activity of 4 novel metallodrugs derivative from valproic acid in adult zebrafish pentylenetetrazole epileptic seizure model.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals

All the chemicals used in this work, such as the aromatic imines 1,10-phenanthroline 99.5% and 2,2-bipyridine 99.5% zinc and copper salt, for chemical synthesis and Pentylenetetrazole (PTZ) for bioactivity tests were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ultra-pure water was obtained from a Millipore Corporate® Milli-Q water system (Billerica, Massachusetts, USA). Ethanol was purchased from MERCK (Darmstadt, Germany).

2.2. Preparation of the zinc and copper valproate complex

Chemical synthesis was performed according to Santos (2015) and Sylla-Iyarreta (2009). The chemical structures, Figure 1, were characterized by the methods of UV-Vis FTIR, High Resolution Mass Spectrometry HRMS (ESI-TOF-MS) and Nuclear Magnetic Resonance NMR for ^1H and ^{13}C and X-Ray. Metal concentrations were determined by Atomic Absorption Spectrophotometry Flame (FAAS).

2.3. Ethics statement

All procedures were approved by the Ethic Committee for Use of Animals - CEUA from Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS - (protocol number 27725).

Fig. 1

2.4. Zebrafish

The zebrafish (*Danio rerio*) shortfin strain were maintained at 28°C with 14h/10h dark/light cycle in an aquatic housing system (ZebTech®) and fed with commercial fish food and brine shrimp (*Artemia sp. Nauplii*). Adult zebrafish (*Danio rerio*; 4 to 6 months-old, $\pm 50:50$ male:female ratio) of heterogeneous wild-type stock were obtained from a local commercial supplier (Delphis, RS, Brazil). Fish were housed in 50-L aquariums (80-100 fish per aquarium) for at least 2 weeks prior to the experiments in order to acclimatize to the animal facility. All tanks were filled with non-chlorinated water previously treated with 132 $\mu\text{L/L}$ AquaSafe® (Tetra, VA, USA) and kept under mechanical and chemical filtration at a targeted temperature of $26 \pm 2^\circ\text{C}$ and water pH at 7.0 to 8.0 (system water). The room illumination was provided by ceiling-mounted fluorescent lamps on a 14/10 light/dark photo period cycle (lights on at 7:00 am). Animals were fed twice a day with a commercial flake fish food (Alcon BASIC®, Alcon, Brazil). All animals used in this study were experimentally naive, healthy and free of any signs of disease. They were maintained according to the National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals (2011).

2.5. Zebrafish - embryonic tests

For zebrafish toxicity test (FET) assessment guideline of the OECD 2013 standard procedure were followed. Unexposed and healthy mature zebrafish (*Danio rerio*) older than 6 months were used for egg production. Spawners were maintained in a recirculating zebtec housing system at $26^\circ\text{C} \pm 2$. The housing system is equipped with a mechanical, a biological, a UV light and an activated carbon filter; pH value is automatic kept at 7.4 and

the conductivity at 500 μ S. The fish medium was prepared by the housing system itself from stock solutions according to OECD 236. The fertilized eggs within 1.5 hours post-fertilization (hpf) which were from 4 to 16-cell stage were placed in a 24 well plate, one embryo per well containing 1 mL of test solution (**table 1**). Positive control (fish medium) and vehicle control (ethanol 0.01%) were used. The embryos were incubated at 27°C.

Table 1.

Fish embryo toxicity assay was performed in fertilization rates $\geq 80\%$. An assay was considered valid if overall survival of embryos in vehicle control was $\geq 90\%$ until hatching. The apical endpoints for the assessment of embryo toxicity and teratogenicity were evaluated each 24 hpf using an inverted microscope (Nikon SMZ 800). Lethality endpoints (coagulation of the embryo, no detection of the heartbeat) and teratogenicity endpoints (malformation of the head, tail, or heart, scoliosis, deformity of yolk, and growth retardation) were evaluated at 72 hpf. All embryos were inspected as described by Kimmel (KIMMEL et al., 1995) and the lethal and teratogenic effects were recorded according to OECD guideline for testing chemicals.

2.6. Anticonvulsant evaluation

Adult animals were carefully weighted and measured in order to select the ones with similar weight and size (35 ± 2 mg and 2 ± 0.15 cm, respectively) to avoid putative variations of drugs pharmacodynamic and pharmacokinetic. In order to keep the same experimental conditions, animals were randomly handled from their home tanks and individually transferred to beakers filled with tricaine 160 μ g/mL and then inoculated intraperitoneally (i.p.) with ethanol 0.01% (control); valproate 87.5 and 175 mM/Kg; [Cu(Valp)₂Phen] and [Cu(Valp)₂Bipy] 10 and 30 mM/Kg; [Zn(Valp)₂Phen] and [Zn(Valp)₂Bipy] 10, 30 and 100 mM/Kg ($n=12$). The injection volume was 10 μ L/g

injected in the right side of the fish 30 min prior the immersion of the animal in the solution of PTZ 10 mM or system water by 20 min (Table 2). The seizure score analysis was performed as: (0) short swim mainly in the bottom of the tank; (1) increased swimming activity and high frequency of opercular movement; (2) burst swimming, left and right movements, and erratic movements; (3) circular movements; (4) clonic seizure-like behavior (abnormal whole-body rhythmic muscular contraction); (5) Fall to the bottom of the tank, tonic seizure-like behavior (sinking to the bottom of the tank, loss of body posture, and principally by rigid extension of the body); (6) death. After PTZ exposure, fish was transferred to an intermediary beaker containing system water to eliminate the entire residual drug in contact with the animal. In order to access the survival rate, the fish were individually transferred to 1 L recipient, filled with system water. The water was renewed every 24 h and the survival was assessed (the total time of this protocol was 168 h). These procedure are in order with Alfaro (2011) Mussulini (2013).

Table 2.

2.7. Statistics

2.7.1. FET test

For all substances were full a full concentration-effect relationship could be determined the LC_{50} values corresponding 95% confidence intervals (CIs) were calculated with Kaplan-Meier followed by Log-rank (Mantel-Cox) as pos hoc, the hatching rate were analyzed statistically with GraphPad Prism software v.6.0 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA). All data were tested for normality and homogeneity of variance.

2.7.2. Anticonvulsant activity

Non-parametric data of seizure scores were expressed as median $\pm$ interquartile range. Scatter plots were designed to enable the analysis of variance across time performed by Friedman test followed by Dunn's Multiple Comparison test as post hoc. Cumulative frequency was determined using the percentage of animal that reached each score across time for the respective treatment tested. The area under the curve (AUC), and latency were represented as mean $\pm$ S.E.M and analyzed by the one-way ANOVA followed by the Bonferroni's test as post hoc. The survival was compared among groups using the log-rank test of trend. In all analyses, the significance level was taken as $p < 0.05$.

3. Results

The stability of these compounds in water solution, it was evaluated through ^1H and ^{13}C NMR. After 24 h, no change was observed in the intensity the original NMR signals or appearance of new signals, which could represents degradation or hydrolyses of the original complex.

3.2. Fish Embryonic Toxicity test (FET)

All organometallic complexes were test in the range between 0.00037 and 100 μM with a final ethanol concentration of 0.001%. The sodium valproate was test in the range between 0.008 and 5000 μM and all the solutions concentrations were freshly made each day prior to the treatment exchange.

The lethal concentration (LC_{50}) and morphological effects of the four organometallics compounds were assessed after 24, 48, 72 and 96 hours post fertilization (hpf) as well as for VPA. Ethanol was used as solvent control (0.001% as

final concentration). According to the OECD the LC_{50} must be determined within 48 hpf and 96 hpf, the values found for VPA (**Figure 2A**) were 5000 μ M and 2340 μ M respectively. We were not able to determine the LC_{50} for the organometallic [Cu(Valp)₂Phen] due to its solubility limit, therefore the maximum concentration tested did not kill half of the embryos during the period of test (**Figure 2B**). In other hand, the most toxic complex were [Cu(Valp)₂Bipy] LC_{50} in 48 hpf was 0.22 μ M and 0.12 μ M in 96 hpf (**Figure 2C**). The organometallics containing zinc displayed a higher survival layout when compared with the copper complexes, due to the solubility limit, once more, the LC_{50} for the [Zn(Valp)₂Phen] could not be calculated (**Figure 2D**) as well in 48 hpf for [Zn(Valp)₂Bipy], the LC_{50} was 10 μ M in 96 hpf (**Figure 2E**).

The copper complexes showed an early mortality across time when compared with the solvent control. In the first 24 hpf 60% of all embryos died (Mantel-Cox; Chi-square = 32.31, $p < 0.0001$) (**Figure 3B**) and 80% in the groups treated with [Cu(Valp)₂Bipy] (Mantel-Cox; Chi-square = 67.94, $p < 0.0001$) (**Figure 3C**). The higher mortality across time in the embryos treated with the organometallics containing zinc ions were accessed at 72 hpf. The compound **3** was the least lethal, around 40% of the embryos died until the end of the analysis (Mantel-Cox; Chi-square = 20.50, $p < 0.001$) show a late mortality (72 hpf) (**Figure 3D**). In the other hand, the groups treated with compound **4** (**Figure 3E**) displayed a prominent mortality at 72 hpf when compared with the others treatments (Mantel-Cox; Chi-square = 50.51, $p < 0.0001$).

On other hand, an important endpoint evaluated were the hatching rate (**Table 3**). Control embryos started hatching from 48 hpf onwards about 96% of larvae hatched within 72 hpf. The embryos treated with the molecule containing copper showed the lower hatching rate at 72 hpf, higher the concentration lower the hatching rate. At the 30 μ M in both complexes, none of the viable larvae hatched. Unlikely the larvae treated

with zinc derivatives, where at the higher concentration rate some embryos hatched. According to these findings, the metal copper plays an important role in the hatching rate through the delay or inhibition of hatch.

The embryonic abnormalities were also tested. The sodium valproate in concentrations higher than 1000 μM (**Figure 4A**) caused malformations such oedema, shortened bent tail, cell death and unhatched.

Table 3.

However, the concentrations of compound **2**, were between 0.37 and 30 μM , at 48 hpf mortality is observed at the highest concentration tested, while no other teratogenic effects were obvious. At 96 hpf a slight retardation in development could be observed, manifested as a delay in hatching (**Figure 4B**). Besides the hatching delay all embryos had spontaneous movements (side-to-side contractions) indicating the formation of somites and detachment of the tail from the yolk sac. The molecule **1** was tested in a wider range between 0.0037 and 30 μM due to the preliminary toxicity evaluation (data non showed), the mortality is observed in lower concentrations, and at 96 hpf could be observed a slight development retardation and delay of hatching (**Figure 4C**), a larger sac yolk area and heart malformation.

Embryos exposed to the range between 0.37 and 100 μM of the organometallic $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ did not show teratogenic endpoints. The hatching occurred until 96 hpf and the embryos showed a normal swimming. Heart malformation occurred and sac yolk edema (**Figure 4D**). The concentrations of $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ testes range were between 0.037 and 100 μM . All larvae hatched within 96 hpf (**Figure 4E**) denoting a slight delay, as well heart malformation, sac yolk edema and yolk sac extension

3.3. Anti-seizure effect

The fish injected with vehicle (control group) displayed a seizure profile similar to Mussulini et al. (2013). The behavioral profile during 20 min of PTZ immersion (10 mM) was characterized by stages defined as scores: (0) short swim, (1) increased swimming activity and high frequency of opercular movement, (2) erratic movements, (3) circular movements, (4) clonic seizure-like behavior, (5) fall to the bottom of the tank and tonic seizure-like behavior, (6) death (MUSSULINI et al., 2013). The animals started a progression of initial seizure scores within five minutes of exposure (**Figure 5A**) displaying all seizure scores in 270 s (**Figure 6A**) and latency to clonic seizure around 150 s (**Figure 7D**). In the last fifteen minutes the animals presented continues transition between score 4 and 5. The seizure intensity analysis indicates an A.U.C of 288 in the first interval (**Figure 7A**), of 532 in the second interval (**Figure 7B**) and of 3456 in the third interval (**Figure 7C**). After 72 h of observation the mortality ratio was 33% (**Figure 7E**).

Animals pretreated with Sodium Valproate 87.5 mM/Kg presented no seizure profile alteration, neither mortality protection. In another hand, animals pretreated with 175 mM/Kg presented a slower progression of score 4 and 5 (**Figures 5C and 6C**) and latency to clonic seizure higher than control (one-way ANOVA; $F [12,143] = 17.29$, $p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$) (**Figure 7D**). The seizure intensity was reduced in the first (one-way ANOVA; $F [12,143] = 21.16$, $p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$), and second (one-way ANOVA; $F [12,143] = 16.06$, $p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$) intervals compared to control (**Figure 7A and 7B**). The mortality ratio was 0% (**Figure 7E**).

Animals pretreated with [Cu(Valp)₂Phen] 10 mM/Kg presented a slower seizure score progression compared to control (**Figure 5D**) taking 120 seconds to 100% of

animals present score 2 and 450 seconds to 50% of the animals present score 5 (**Figure 6D**).

However, there was no difference in latency to seizure compared to control (**Figure 7D**). The seizure intensity was reduced in the first (one-way ANOVA; $F [12,143] = 21.16, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$), and second (one-way ANOVA; $F [12,143] = 16.06, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$) intervals compared to control (**Figure 7A and 7B**). The mortality ratio was 25% (**Figure 7E**). In another hand, animals pretreated with the same compound at the dose of 30 mM/Kg presented a faster progression of seizure score compared to control (**Figure 5E**) and all animals presented the five seizure score within 180s (**Figure 6E**). There was no statistical difference regarding seizure intensity and latency to score 4 compared to control (**Figure 7A, 7B, 7C and 7D**). The mortality ratio was 41% (**Figure 7E**).

Animals pretreated with [Cu(Valp)₂Bipy] 10 mM/Kg presented an even more slower seizure score progression compared to control and a return to initial seizure scores in the last fifteen minutes of observation (**Figure 5F**). Only with 120s 100% of the animals presented score 1 and just 33% of the animals presented clonic seizure within 300 seconds (**Figure 6F**). The seizure intensity was reduced in the first (one-way ANOVA; $F [12,143] = 21.16, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$), second (one-way ANOVA; $F [12,143] = 16.06, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$), and third (one-way ANOVA; $F [12,143] = 6.736, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$), intervals compared to control (the only treatment with a lower seizure intensity in the last interval) (**Figure 7A, 7B and 7C**) and the higher latency to clonic seizure (one-way ANOVA; $F [12,143] = 17.29, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$, mean time to seizure 515 sec) (**Figure 7D**). The mortality ratio was 8% (**Figure 7E**). In another hand, animals pretreated with [Cu(Valp)₂Bipy] 30 mM/Kg presented no visible anti-seizure effect as the lower dose.

The seizure behavior profile was similar to control (**Figure 5G**) and all seizure scores within 180s (**Figure 6G**) with no difference in latency to score 4 (**Figure 7D**). The seizure intensity was slight reduced in the first (one-way ANOVA; $F [12,143] = 21.16$, $p < 0.05$; post-hoc, $p < 0.05$), second (one-way ANOVA; $F [12,143] = 16.06$, $p < 0.05$; post-hoc, $p < 0.05$) intervals compared to control (**Figure 7A and 7B**). The mortality ratio was 25% (**Figure 7E**).

Animals pretreated with $[Zn(Valp)_2Phen]$ 10 mM/Kg presented no seizure profile alteration. At concentrations of 30 and 100 mM/Kg presented a slower seizure score progression compared to control with visible alteration in the higher dose, as well as 75% of the animals displaying only score 1 and 2 in the last minute of observation (**Figure 5I and 5J**). In both dose 50% of animals took 300s to present score 4 and in the higher concentration there was no seizure score before 1 minute of analysis (**Figure 6I and 6J**). The latency to clonic seizure was similar between the two groups and higher than control (one-way ANOVA; $F [12,143] = 17.29$, $p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$) (**Figure 7D**). Both doses presented a lower seizure intensity in the first (one-way ANOVA; $F [12,143] = 21.16$, $p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$) and second (one-way ANOVA; $F [12,143] = 16.06$, $p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$) intervals compared to control with lowest intensity in the first interval when animals are injected with the higher dose (**Figure 7A and 7B**). The mortality ratio was 25%, 25% and 0% respectively (**Figure 7E**).

Animals pretreated with all doses of $[Zn(Valp)_2Bipy]$ presented alteration under seizure profile, mainly in the initial 300s (**Figure 5K, 5L and 5M**). In the same time interval, all doses slowed down the progression of all scores (**Figure 6K, 6L and 6M**). The Latency to clonic seizure was higher than control in animals treated with 30 and 100 mM/Kg (one-way ANOVA; $F [12,143] = 17.29$, $p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$)

(**Figure 7D**). All doses presented a lower seizure intensity in the first interval (one-way ANOVA; $F [12,143] = 21.16, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$) and animals treated with 30 and 100 mM/Kg presented lower seizure intensity in the second interval (one-way ANOVA; $F [12,143] = 16.06, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$), compared to control (**Figure 7A and 7B**). The mortality ratio was 25%, 25% and 0% respectively (**Figure 7E**).

To avoid graphic visual pollution in multiple comparisons among groups we add the **Tables 4, 5, 6 and 7**, referent to **Figures 7A, 7B, 7C and 7D**, respectively. In regarding with Sodium Valproate 175 mM/Kg comparison with the other pretreatments, animals injected with [Cu(Valp)₂Bipy] 10 mM/Kg, [Zn(Valp)₂Phen] 100 mM/Kg and [Zn(Valp)₂Bipy] 10, 30 and 100 mM/Kg during 0 – 150 seconds interval (one-way ANOVA; $F [12,143] = 21.16, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$). In the second interval, pretreatment with [Cu(Valp)₂Bipy] 10 mM/Kg and [Zn(Valp)₂Bipy] 30 and 100 mM/Kg, reduced the seizure intensity compared to Sodium Valproate 175 mM/Kg (one-way ANOVA; $F [12,143] = 16.06, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$). Only the treatment with [Cu(Valp)₂Bipy] 10 mM/Kg was able to reduce the seizure intensity in the last interval of observation (one-way ANOVA; $F [12,143] = 6.736, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$), and latency to clonic seizure (one-way ANOVA; $F [12,143] = 17.29, p < 0.0001$; post-hoc, $p < 0.05$), compared to Sodium Valproate 175 mM/Kg .

4. Discussion

The synthesis of metal complexes is a recent approach to obtain bioisosters drugs. The organocomplexes or coordination compounds are molecules with mixed chemical function, which consist of organic molecules bound to metal in a geometric arrangement known as coordination sphere. The activity the organic metal coordination

compounds has a great importance to life maintenance. However, investigating and establishing the activity of a new drug alone is not sufficient; the toxic action should also be evaluated for safety concerns. In order to predict toxicity in humans, different models have been performed.

The zebrafish emerged in the scenarios of pharmacologic screening therapy for epilepsy in 2005 (BARABAN et al., 2005). In the last 10 years zebrafish epileptic seizure model has been deeply characterize (GRONE & BARABAN, 2015), increase our knowledge about the model and strength the translation impact of this animal model to study epilepsy (AFRIKANNOVA, 2012). Adult zebrafish allows easy intra-peritoneal injection, avoiding any extracorporeal effect of compounds, such as eye contact, gill accumulation leading to breathing alterations, and the most important fact, it allows doses comparison (ALFARO; RIPOLL-GÓMEZ; BURGOS, 2011).

The first point of the study was to delimitate a dose of sodium valproate which could elucidate an anti-seizure effect. We based our initial protocol in the study of Luszcki (2006), where the authors of the article indicated the ED 50 of Sodium Valproate as 87.5 $\mu\text{M}/\text{Kg}$. As we can see in **Figure 5 – 7** there was no anti-seizure effect on this concentration. Thus we double the concentration and found a clear anti-seizure effect increasing the mean time to clonic-seizure from 151 seconds to 297 seconds (**Figure 7D**). To be able to compare the dose with the other doses we converted all the treatments to mM/Kg . As soon as we injected the compounds $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ and $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ in the same dose as Sodium Valproate (175 mM/Kg) the animals presented abnormal behavior, like burst, jumps and circular movements indicating possible toxicological effect of the compound (IBRAHIM et al., 2014).

This result led us to test the toxic doses of these compounds. In this way, we performed a toxicological screening in larva zebrafish to detect the Maximal Concentration to work without such effects.

The fish embryo toxicity test (FET) was design to determine the acute toxicity of chemicals on embryonic stages of fish and it has been used for toxicity screening of new compounds, including AED (JOHNSON; CAREW; SLOMAN, 2007; SELDERSLAGHS et al., 2009; TEIXIDÓ et al., 2012). The first challenges of testing new compounds are the determination of solubility, maximum soluble concentration and finding an adequate solvent. As many compound exhibit limited solubility in aqueous solution, the use of organic solvents is required to create stock solutions that than can be diluted in the embryo medium (MAES et al., 2012). All the organometallics complexes were soluble in ethanol (99.9%) and the maximum solubility concentration follows: $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ 38 mM, $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ 190 mM, $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ 180 mM and $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ 190 mM. It is known that ethanol causes severe malformations defects in zebrafish embryos; therefore, the maximum final concentration in the test plate was 1 ml/L. Based on the results of Morgant (2012), which had been worked with anti-inflammatory assay in zebrafish larvae, the maximum tolerated concentration for $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ was 10 μM and 100 μM for $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$. Based on these results, we chose our concentration range.

We were able to calculate the lethal concentration (LC_{50}) only for the complexes with the protector group bipyridyne (**Figure 2C and 2E**), with the copper complex displayed a lower LC_{50} . On other hand, we could not determine the LC_{50} due to solubility limit and ethanol final concentration limit (**Figure 2B and 2D**) for the phenantroline compounds.

By contrast, was evaluated the mortality across time and the metals played a different way. The complexes with copper generated an early death, at 24 hpf during the pharyngula period (**Figure 3B and 3C**). Differently, the zinc complexes induced death at the early larvae stage, 72 hpf when the embryo has complete formation (**Figure 3D and 3E**). For the embryos tested with sodium valproate de LC_{50} was similar with Selderslaghs (2009) previous work, 2.09 mM. Therefore, we were able to reproduce a similar concentration range (**Figure 3A**) (SELDERSLAGHS et al., 2009).

In the morphologic evaluation, the metals seems to influence the hatching rate (**Table 3**) where the larvae exposed to copper complexes were unable to hatch, even if the larvae does not hatched the animal development continues normally or with some delay. Regarding, zinc did not alter the hatching rate as significantly as copper but still induced some morphological alteration like heart malformation enabling the organ to pump blood and therefore affecting the circulation, pool blood concentration in the yolk sac as well some necrosis (**Figure 4D and 4E**). Heart malformation were detected in the larvae exposed to copper organometallics, but the blood circulation was preserved; there was some necrosis and yolk sac edema especially in the larvae treated with $[Cu(Valp)_2Bipy]$ (**Figure 4B and 4C**). The highest viable sodium valproate (**Figure 4A**) concentration tested provoked morphological defects as reported on the literature (HERRMANN, 1993; SELDERSLAGHS et al., 2009). The embryos treated with ethanol (0.001%) did not develop any morphological alteration (**Figure 4F**).

As soon as, the results on larvae zebrafish toxicological screening, we tested the anticonvulsant effects in adult zebrafish. Even though $[Cu(Valp)_2Phen]$ presented no effect under seizure latency in the dose of 10 mM/Kg (**Figure 7D**), it presented the same effects under seizure intensity as Sodium Valproate at the dose of 175 mM/Kg (**Figure 7A and 7B**). In another hand, the same compound at the dose of 30 mM/Kg,

presented a similar profile as control and increased the seizure intensity in the first five minutes, because the animals presented more score 5 in the same period compared to control (**Figure 7A and 5**). A similar profile could be observed using [Cu(Valp)₂Bipy], because animals treated with the lower dose presented an clear anti-seizure effect and the higher dose starts to lower this effect (**Figures 5 - 7**). Furthermore, the group [Cu(Valp)₂Bipy] 10 mM/Kg was the only one to present an higher seizure latency compared to the group Sodium Valproate 175 mM/Kg, as well as the only treatment able to lower the seizure intensity in the last 15 min of observation when only 25% of the animals presented score 5 (**Figure 5F and 7**).

Because the only difference of the last two compounds was the metal ion and both presented an anti-seizure effect inversely proportional to its dose, we aimed to change Cu⁺² to Zn⁺² metal ion in the molecules. It enables as to test higher doses (**Figure 2 – 4**) and reversed such inversely proportional effects, as well as made it more stable. Based on **Figure 5 - 7** the compounds [Zn(Valp)₂Phen] and [Zn(Valp)₂Bipy] no shows impact under latency to clonic-seizure in the groups 10 mM/Kg. In another hand both groups treated with 100 mM/Kg had full death prevention.

An interesting result was observed with the treatment with [Zn(Valp)₂Bipy]. All doses were able to reduce the seizure intensity in the first interval of analysis (0 – 150 sec) when compared to Sodium Valproate, at 30 mM/Kg, still enable a lower seizure intensity even in the second interval of analysis compared to the classical treatment molecule. This may be due to differences between 1,10 phenantroline (Phen) and 2,2'-bipyridine (Bipy) as ligand. Popa *et al* (2006) have shown that 1,10 phenantroline is a sodium channel blocker, which induces a use – and voltage-dependent block. The strength and occurrence of hydrogen bonds could be formed between Phen and a putative receptor site within the pore region are critically determined by the orientation

of the molecules involved, so the local membrane electric field would directly act on binding of Phen.

Copper and zinc also play an important part in CNS. According to Horning (2001) both ions can modulate synaptic transmission postsynaptically via direct actions on glutamate, GABA, or glycine receptors. Zinc and copper could have presynaptic effects on transmitter release via inhibition of voltage-gated calcium channels. In addition to these effects on neurotransmission, zinc and copper can influence neuronal excitability by modulating voltage-gated ion channels, displaying distinct effects on voltage-gated K^+ channels and input resistance, effects that may alter a neurons capacity to repetitively fire action potentials (HORNING, 2001).

As conclusion, we are able to perform a screening using Zebra Fish model for new organometallics drugs with anticonvulsant activity. About the toxicity, embryos exposed to organometallic complexes containing copper (Cu) showed a higher mortality in the first 24 hpf, however the zinc (Zn) compounds showed higher mortality after 72 hpf. The complex $[Cu(Valp)_2Bipy]$ showed the highest toxicity, with an extremely low lethal concentration when compared to the complex $[Cu(Valp)_2Phen]$. Both were more toxic in comparison with zinc derivatives.

In other hand, all the organometallic tested here were more effective against seizures induced by pentylenetetrazole in zebrafish than sodium valproate. Among all, the $[Cu(Valp)_2Bipy]$ showed the best anticonvulsant effects, but due to its toxic effects on embryos and larvae, the $[Zn(Valp)_2Bipy]$ should be considered the most promising for future studies as anticonvulsant drug.

Figures and Legends

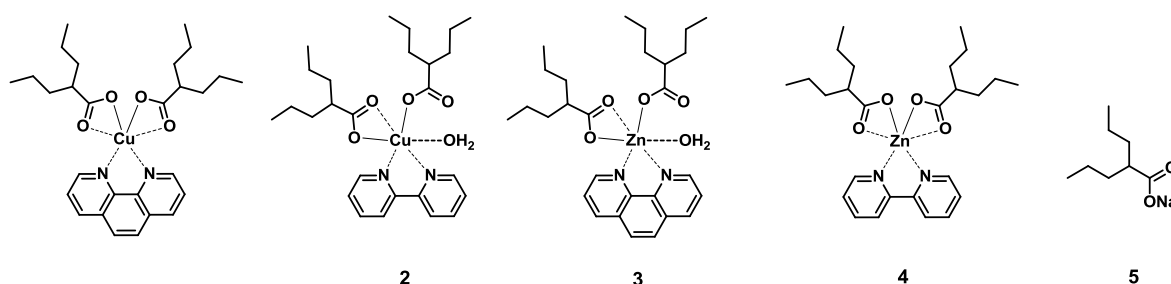


Fig.1. Representatives chemical structures of tested compounds: (1) [bis(2-propil-pentanoate)(1,10-phenanthroline)copper(II)] or [Cu(Valp)₂Phen]; (2) [bis(2-propil-pentanoate)(2,2-bipyridine)copper(II)] or [Cu(Valp)₂Bipy]; (3) [bis(2-propil-pentanoate)(1,10-phenanthroline)zinc(II)] or [Zn(Valp)₂Phen], (4) [bis(2-propil-pentanoate)(2,2-bipyridine)zinc(II)] or [Zn(Valp)₂Bipy]; and (5) sodium valproate (2-propil-pentanoate).

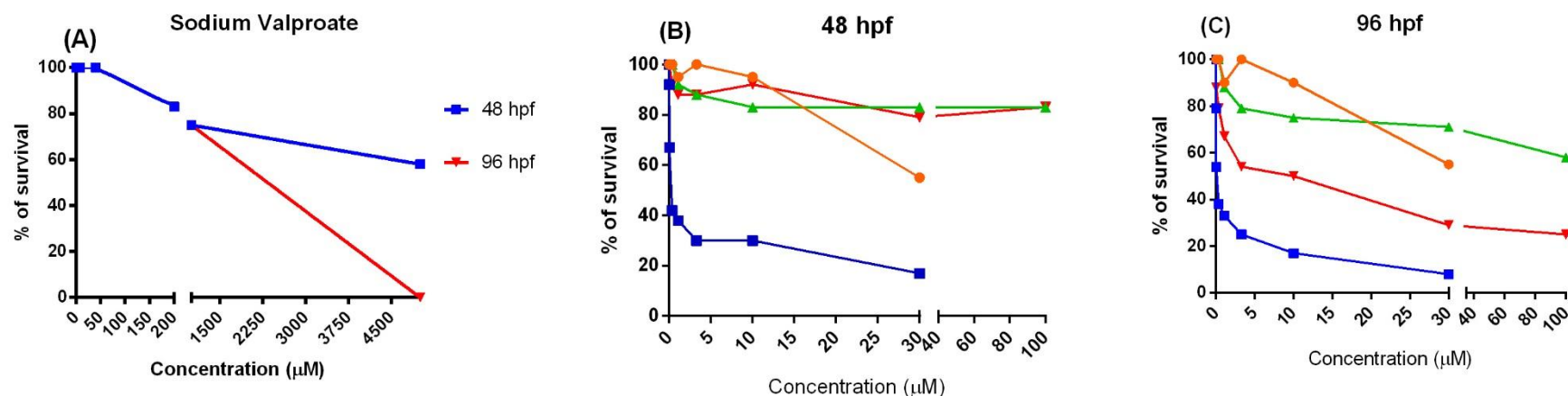


Fig.2. Lethal concentration determination (LC₅₀) for the organometallics and sodium valproate through accumulated mortality (48 hpf and 96 hpf).

(A) Sodium Valproate, accumulate mortality 5000 μM and 2340 μM . (B) 48 hpf [Cu(Valp)₂Phen] couldn't be determined due to solubility limit. [Cu(Valp)₂Bipy] LC₅₀ = 0.22 μM ; [Zn(Valp)₂Phen] and [Zn(Valp)₂Bipy] could not be determined due to solubility limit. (C) LC₅₀ values for 96 hpf: [Cu(Valp)₂Phen] couldn't be determined due to solubility limit; [Cu(Valp)₂Bipy] LC₅₀ = 0.12 μM (96 hpf); [Zn(Valp)₂Phen] couldn't be determined due to solubility limit and [Zn(Valp)₂Bipy] LC₅₀ value 10 μM . —●— [Cu(Valp)₂Phen]; —■— [Cu(Valp)₂Bipy]; —▼— [Zn(Valp)₂Phen]; —▲— [Zn(Valp)₂Bipy].

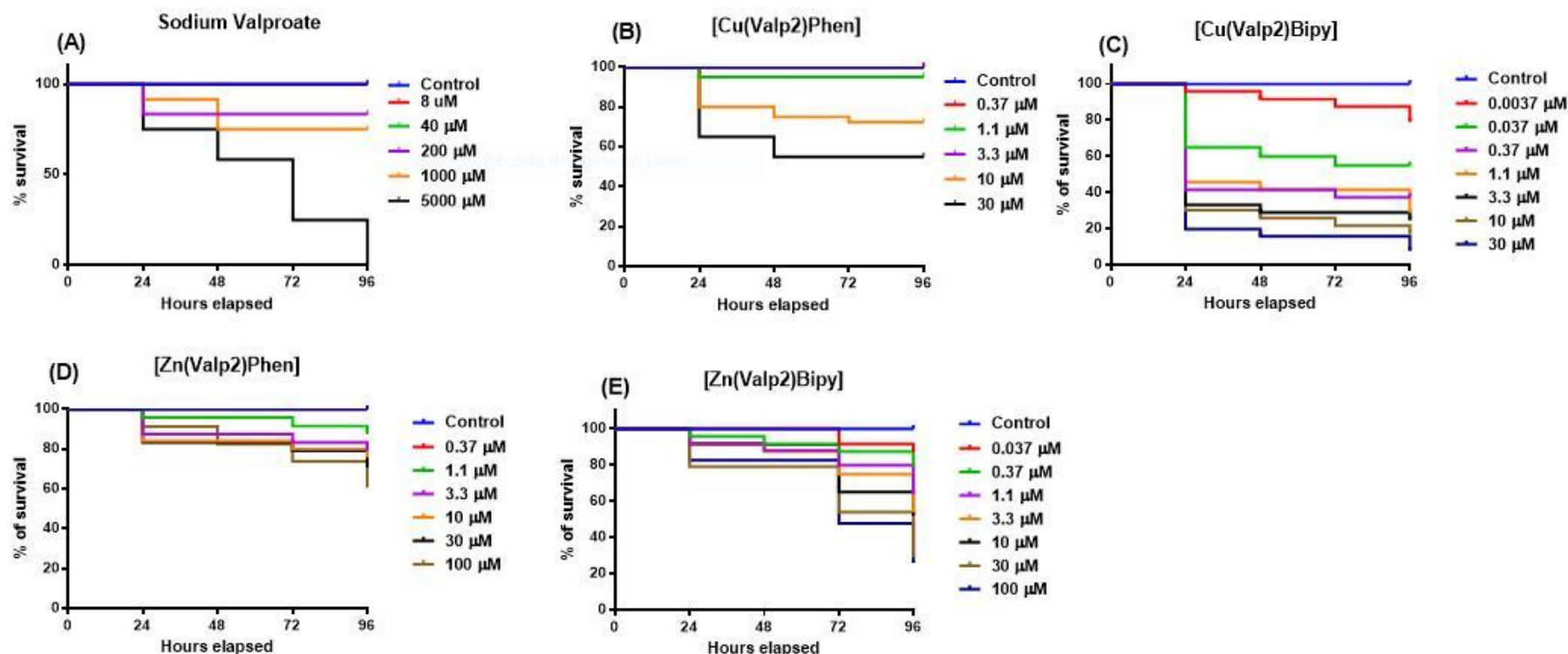


Fig. 3. Mortality across time. (A) Sodium Valproate shows a constant mortality across time at the higher concentration (5000 μ M). Organometallics containing copper displayed an early embryo mortality at 24 hpf (hours post fertilization) (B) [Cu(Valp)₂Phen] (1) and (C) [Cu(Valp)₂Bipy] (2). In other hand the compounds containing zinc (D) [Zn(Valp)₂Phen] (3) and (E) [Zn(Valp)₂Bipy] (4) showed a higher mortality at the larvae stage (72 hpf). (Kaplan-Meier curves followed by Long-rank analysis – compounds (A) $p < 0.001$. (B), (C) and (E) $p < 0.0001$. (D) $p < 0.005$).

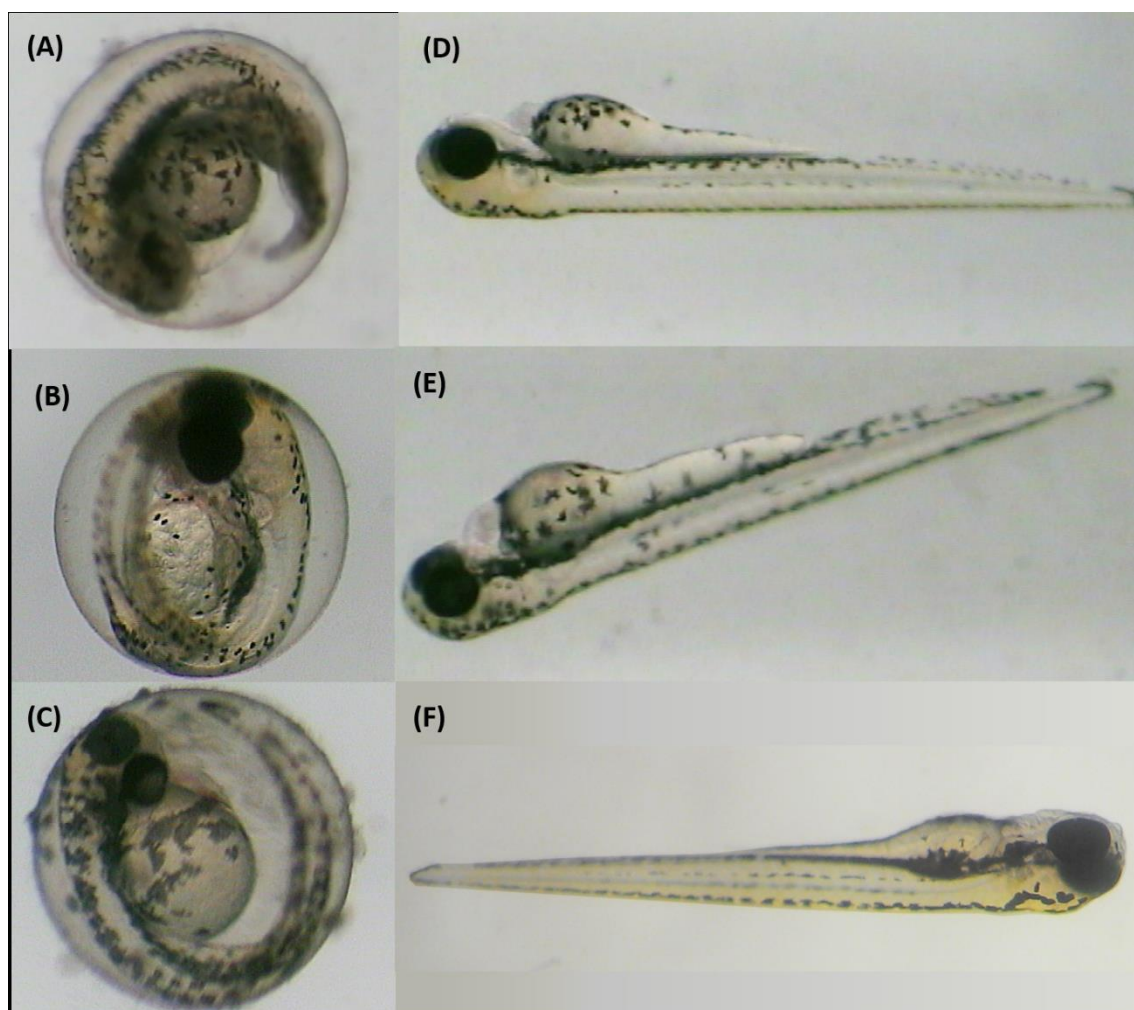


Fig. 4. Photographs of embryos at 96 hpf exposed to maximum viable concentration. (A) Sodium Valproate, 1000 μM caused malformations such oedema, shortened bent tail, necrosis and unhatched. (B) $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$, 30 μM , unhatched embryo. (C) $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$, 30 μM , larger sac yolk area, heart malformation, pool blood and unhatched embryo. (D) $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$ at 100 μM , heart malformation occurred and sac yolk edema. (E) $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipy}]$ at 100 μM , embryo with heart malformation, pool blood, necrosis, sac yolk edema and yolk sac extension. [F] Solvent Control group, ethanol 0.001%. Denoting no mal formation or teratogenic effect.

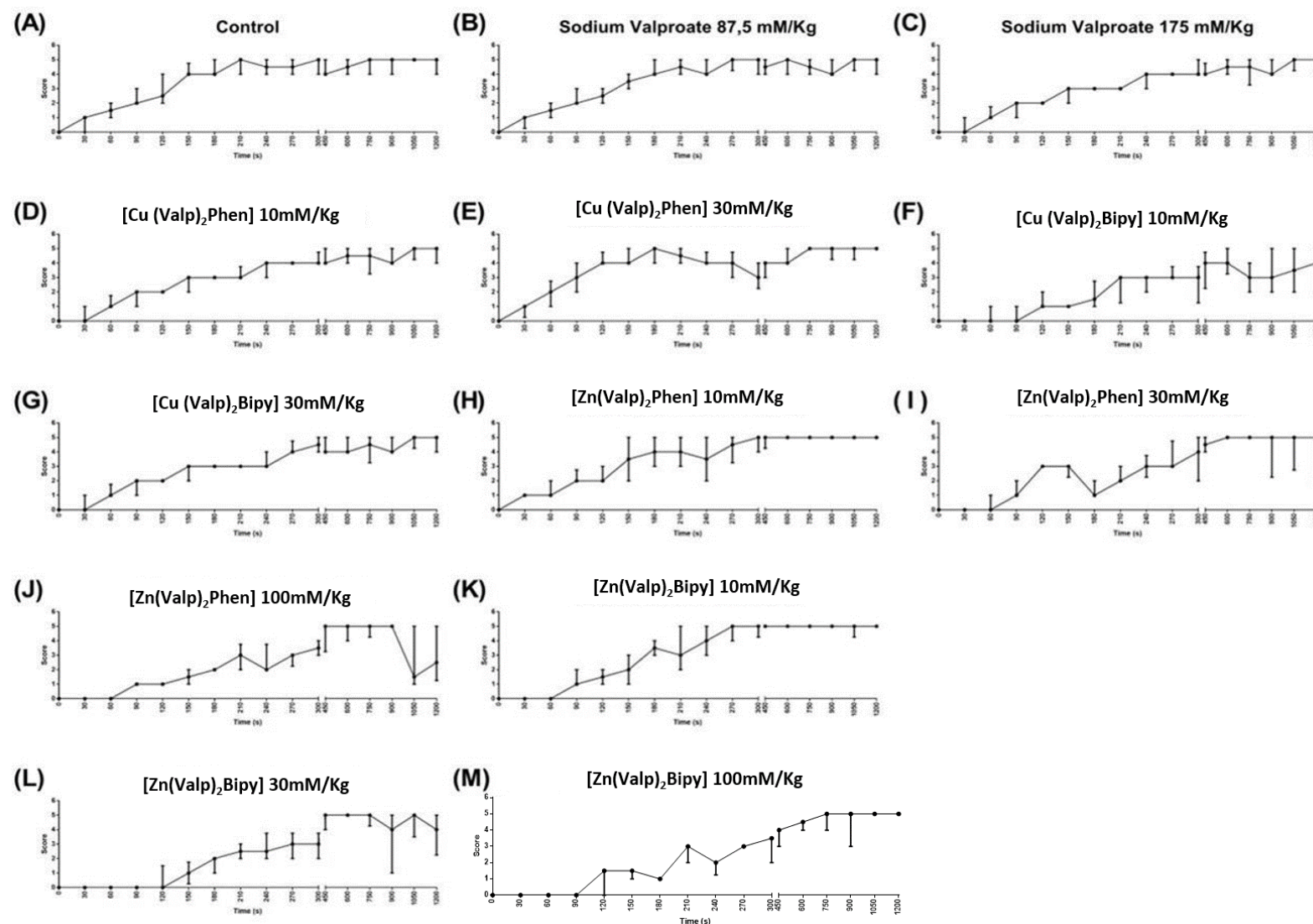


Fig.5. Behavioral score seizure profile of PTZ and anti-seizure molecules pretreatment. The seizure score are depicted in Y-Axis. The X-Axis shows two time intervals. The first is 0 – 300 seconds when we can see the beginning of the seizure. The second is 300 – 1200 seconds when control reach seizure behavior profile stability altering between score 4 and 5. All treatments are depicted in each graph (A) – (M). Data are represented as median $\pm$ interquartile ranges.

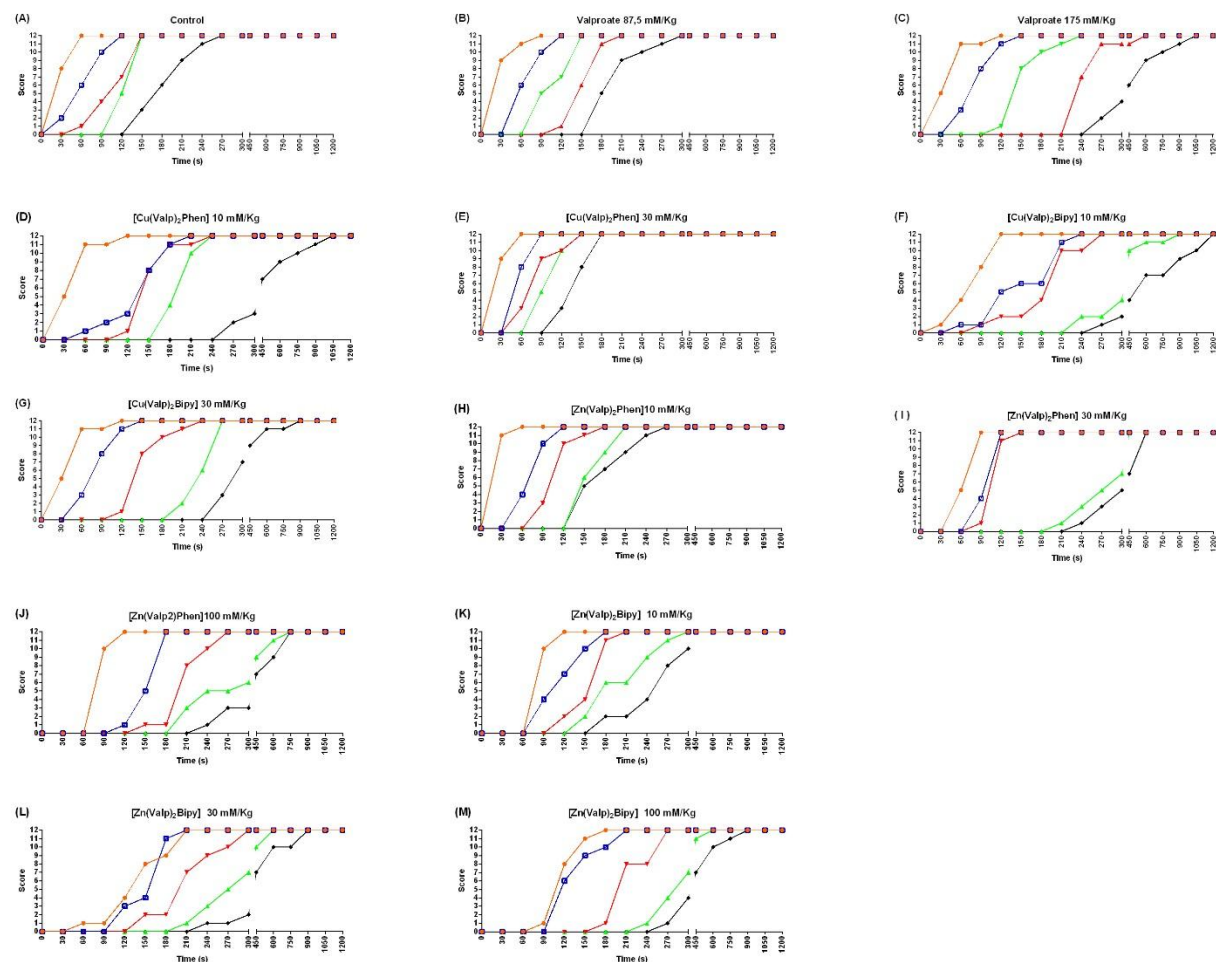


Fig.6. Behavioral cumulative frequency score seizure profile of PTZ and anti-seizure molecules pretreatment. Data are represented as the animal index (%) that reached the scores across time. The cumulative frequencies are depicted in Y-Axis. The X-Axis shows two time intervals. The first is 0 – 300 seconds when we can see the beginning of the seizure. The second is 300 – 1200 seconds when control reach seizure behavior profile stability altering between score 4 and 5. All treatments are depicted in each graph (A) – (M). The representation of each score is as followed: ● score 1; ■ score 2; ▲ score 3; ★ score 4; ◆ score 5.

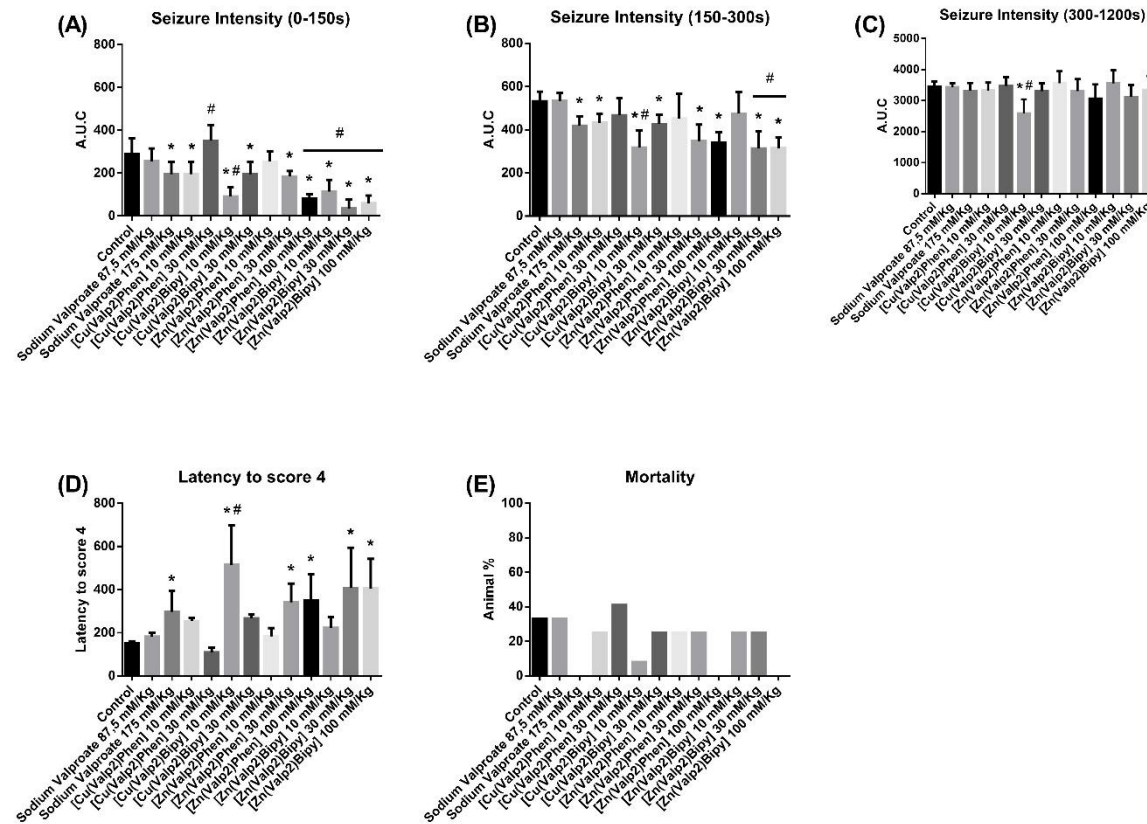


Fig.7. Statistical comparison of behavioral profile of PTZ-induced seizures in adult zebrafish. Seizure intensity during three distinct moment tests [0–150 s (A); 150–300 s (B); and 300–1200 s (C)] evaluated by the area under curve observed for each treatment. (D) Latency to score 4 onset. Data from seizure intensity and latency are represented as mean $\pm$ S.E.M and analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni's test as post-hoc. (E) Mortality ratio represented as % of animals. The * indicates statistical difference compared to control and # indicates statistical difference to Sodium Valproate 175 mM/Kg

Table 1. Concentration range tested in the FET.

Compound	Concentrations (μM)
[Cu(Valp) ₂ Phen]	0.37, 1.11, 3.33, 10, 30
[Cu(Valp) ₂ Bipy]	0.0037, 0.037, 0.37, 1.11, 3.33, 10, 30
[Zn(Valp) ₂ Phen]	0.37, 1.11, 3.33, 10, 30, 100
[Zn(Valp) ₂ Bipy]	0.037, 0.37, 1.11, 3.33, 10, 30, 100
Sodium Valproate	8, 40, 200, 1000, 5000

Table 2. Concentration range evaluated in the anticonvulsant test.

Compound	Concentrations (mM/Kg)
[Cu(Valp) ₂ Phen]	10 and 30
[Cu(Valp) ₂ Bipy]	10 and 30
[Zn(Valp) ₂ Phen]	10, 30 and 100
[Zn(Valp) ₂ Bipy]	10, 30 and 100
Sodium Valproate	87.5 and 175

Table 3. Hatching of zebrafish embryos (72 hpf) exposed to each organometallic derivative from valproic acid.

Compound				
Concnetration (μ M)	[Cu(Valp) ₂ Phen] ^a	[Cu(Valp) ₂ Bipy] ^b	[Zn(Valp) ₂ Phen]	[Zn(Valp) ₂ Bipy]
0	20/20	24/24	24/24	24/24
0.0037	<u>n.t</u>	17/21	<u>n.t</u>	<u>n.t</u>
0.037	<u>n.t</u>	13/14	<u>n.t</u>	15/22
0.37	11/20	09/09	24/24	06/21
1.11	09/18	10/10	22/22	05/19
3.33	02/18	01/07	15/20	11/18
10	0/18	0/06	10/19	10/16
30	0/11	0/04	03/19	03/11
100	<u>n.t</u>	<u>n.t</u>	14/17	08/12

Abbreviations used: (hpf) hours post fertilization; (n.t) no tested

^a Contingency (*Chi-square*, *df* = 25.01,5 *p*<0.0001)

^b Contingency (*Chi-square*, *df* = 5.935,1 *p*<0.05)

All data are represented according with the hatching rate of viable embryos tested with different complexes range (hatching/larvae).

Table 4. Multiple-comparison of seizure intensity in the first interval..

Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?
Control vs. Sodium Valproate 87,5 mM/Kg	33,13	-41,09 to 107,3	No
Control vs. Sodium Valproate 175 mM/Kg	93,75	19,54 to 168,0	Yes
Control vs. [Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg	93,75	19,54 to 168,0	Yes
Control vs. [Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	-62,5	-136,7 to 11,71	No
Control vs. [Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	197,5	123,3 to 271,7	Yes
Control vs. [Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	93,75	19,54 to 168,0	Yes
Control vs. [Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg	35	-39,21 to 109,2	No
Control vs. [Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	105	30,79 to 179,2	Yes
Control vs. [Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg	208,8	134,5 to 283,0	Yes
Control vs. [Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	175	100,8 to 249,2	Yes
Control vs. [Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	253,8	179,5 to 328,0	Yes
Control vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	230	155,8 to 304,2	Yes
Sodium Valproate 87,5 mM/Kg vs. Sodium Valproate 175 mM/Kg	60,63	-13,59 to 134,8	No
Sodium Valproate 87,5 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg	60,63	-13,59 to 134,8	No
Sodium Valproate 87,5 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	-95,63	-169,8 to -21,41	Yes
Sodium Valproate 87,5 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	164,4	90,16 to 238,6	Yes
Sodium Valproate 87,5 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	60,63	-13,59 to 134,8	No
Sodium Valproate 87,5 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg	1,875	-72,34 to 76,09	No
Sodium Valproate 87,5 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	71,88	-2,339 to 146,1	No
Sodium Valproate 87,5 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg	175,6	101,4 to 249,8	Yes
Sodium Valproate 87,5 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	141,9	67,66 to 216,1	Yes
Sodium Valproate 87,5 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	220,6	146,4 to 294,8	Yes
Sodium Valproate 87,5 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	196,9	122,7 to 271,1	Yes
Sodium Valproate 175 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg	0	-74,21 to 74,21	No
Sodium Valproate 175 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	-156,3	-230,5 to -82,04	Yes
Sodium Valproate 175 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	103,8	29,54 to 178,0	Yes
Sodium Valproate 175 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	0	-74,21 to 74,21	No
Sodium Valproate 175 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg	-58,75	-133,0 to 15,46	No
Sodium Valproate 175 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	11,25	-62,96 to 85,46	No
Sodium Valproate 175 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg	115	40,79 to 189,2	Yes
Sodium Valproate 175 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	81,25	7,036 to 155,5	Yes
Sodium Valproate 175 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	160	85,79 to 234,2	Yes
Sodium Valproate 175 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	136,3	62,04 to 210,5	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	-156,3	-230,5 to -82,04	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	103,8	29,54 to 178,0	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	0	-74,21 to 74,21	No
[Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg	-58,75	-133,0 to 15,46	No
[Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	11,25	-62,96 to 85,46	No
[Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg	115	40,79 to 189,2	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	81,25	7,036 to 155,5	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	160	85,79 to 234,2	Yes

[Cu(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	136,3	62,04 to 210,5	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	260	185,8 to 334,2	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	156,3	82,04 to 230,5	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg	97,5	23,29 to 171,7	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	167,5	93,29 to 241,7	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg	271,3	197,0 to 345,5	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	237,5	163,3 to 311,7	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	316,3	242,0 to 390,5	Yes
[Cu(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	292,5	218,3 to 366,7	Yes
[Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg vs. [Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	-103,8	-178,0 to -29,54	Yes
[Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg	-162,5	-236,7 to -88,29	Yes
[Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	-92,5	-166,7 to -18,29	Yes
[Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg	11,25	-62,96 to 85,46	No
[Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	-22,5	-96,71 to 51,71	No
[Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	56,25	-17,96 to 130,5	No
[Cu(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	32,5	-41,71 to 106,7	No
[Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg	-58,75	-133,0 to 15,46	No
[Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	11,25	-62,96 to 85,46	No
[Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg	115	40,79 to 189,2	Yes
[Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	81,25	7,036 to 155,5	Yes
[Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	160	85,79 to 234,2	Yes
[Cu(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	136,3	62,04 to 210,5	Yes
[Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg	70	-4,214 to 144,2	No
[Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg	173,8	99,54 to 248,0	Yes
[Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	140	65,79 to 214,2	Yes
[Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	218,8	144,5 to 293,0	Yes
[Zn(Valp2)Phen] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	195	120,8 to 269,2	Yes
[Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg	103,8	29,54 to 178,0	Yes
[Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	70	-4,214 to 144,2	No
[Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	148,8	74,54 to 223,0	Yes
[Zn(Valp2)Phen] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	125	50,79 to 199,2	Yes
[Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg	-33,75	-108,0 to 40,46	No
[Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	45	-29,21 to 119,2	No
[Zn(Valp2)Phen] 100 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	21,25	-52,96 to 95,46	No
[Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg	78,75	4,536 to 153,0	Yes
[Zn(Valp2)Bipy] 10 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	55	-19,21 to 129,2	No
[Zn(Valp2)Bipy] 30 mM/Kg vs. [Zn(Valp2)Bipy] 100 mM/Kg	-23,75	-97,96 to 50,46	No

4. DISCUSSÃO GERAL

Aproximadamente 50 milhões de pessoas convivem com a epilepsia atualmente (WHO, 2015). Esta doença crônica cerebral é caracterizada pela presença de convulsões recorrentes, as quais podem envolver uma única parte do corpo (parcial) ou o corpo inteiro (generalizada), além dos episódios convulsivos também pode ocorrer a perda da consciência (BRUNTON, 2012).

O controle e prevenção das crises convulsivas se dão por meio do uso de medicamentos através da monoterapia (um único medicamento) ou politerapia (dois ou mais medicamentos associados). O valproato de sódio é um anticonvulsivante de amplo espectro eficaz no tratamento das crises de ausência a das convulsões mioclônicas, parciais e tônico-clônicas. A dose diária inicial geralmente é 15 mg/Kg, que pode ser aumentada a intervalos semanais em 5 – 10 mg/kg/dia até a dose máxima de 60 mg/kg/dia. Os efeitos adversos do ácido valproico estão relacionados com a dose e o uso crônico, sendo que os efeitos mais severos ocorrem no fígado (hepatotoxicidade) e na malformação fetal (teratogenicidade) (CHATEAUVIEUX et al., 2012; NANAU; NEUMAN, 2013). Os bebês nascidos de mães epiléticas têm risco duas vezes maior de apresentar malformações congênitas graves, quando comparados com crianças de mães não epiléticas (4-8% *versus* 2-4%). Essas malformações incluem cardiopatias congênitas, anomalias do tubo neural, fenda palatina e outras (CHATEAUVIEUX et al., 2010; BRUNTON, 2012).

Apesar da vasta gama de medicamentos disponíveis, cerca de 30% dos pacientes apresentam epilepsia refratária o que resulta na necessidade da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Ademais, é imprescindível a escolha de um

modelo animal que consiga reproduzir a patologia em questão e que apresente manipulação.

Os compostos a serem testados neste modelo animal podem ser adicionados no meio ou administrados através de micro injeção em larvas possibilitando a avaliação da toxicidade. Ademais, o *zebrafish* apresenta um claro comportamento e manifestações eletrofisiológicas de convulsão, anticonvulsivante (avaliação da locomoção) e antiepiléptico (gravação da atividade elétrica extracelular) (BAUSH, 2009).

A supressão de convulsões induzidas por PTZ em *zebrafish* pode fornecer um método rápido para a seleção dos melhores candidatos à fármacos em larga escala. Este tipo de seleção pode servir como um primeiro passo a fim de escolher os candidatos mais proeminentes para testes em modelos mais complexos, como em roedores (BARABAN, 2006; HORTOPAN; DINDAY; BARABAN, 2010).

A síntese e estudo de complexos metálicos com drogas ativas como ligantes têm aberto uma estimulante área de pesquisa. Apenas uma pequena parcela de moléculas biologicamente ativas que figuram no mercado são de origem inorgânica ou apresentam metais de transição na sua composição

A síntese química dos complexos organometálicos derivados do ácido valpróico foi realizada segundo Santos (2015). As estruturas químicas foram caracterizadas pelas metodologias de espectrofotometria de UV-Vis, espectrometria de infravermelho (FTIR), espectrometria de massas (ESI-TOF-MS) e espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) para ^1H e ^{13}C para os análogos com Zn^{++} . Os teores dos metais foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica de chama (FAAS). A partir desses métodos foi possível determinar as fórmulas químicas e estruturas moleculares

apresentadas na Figura 4. A confirmação da estrutura dimensional dos complexos foi realizada por RMN e a estrutura da molécula $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$ está exemplificada na Figura 5.

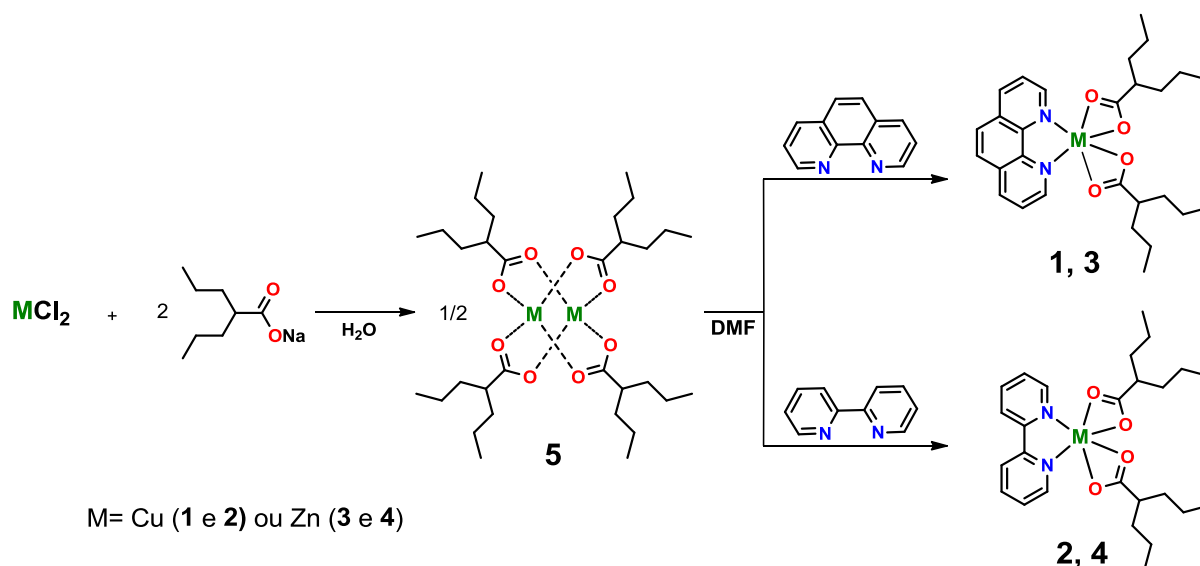


Figura 4. Esquema de síntese para obtenção dos complexos organometálicos. (5) Valproato de sódio, (1) $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$, (3) $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$, (2) $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$ e (4) $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Phen}]$. Adaptado de Santos (2015).

Foram avaliadas a toxicidade embrionária em embriões de *zebrafish* e a atividade anticonvulsivante dos complexos organometálicos em peixes adultos (*zebrafish*) induzidos a convulsão através da exposição ao pentilenotetrazol (PTZ, 10mM).

Os testes de toxicidade embrionária (FET) neste modelo (OECD, 2006) são utilizados para avaliar a toxicidade aguda de substâncias químicas no desenvolvimento dos embriões e larvas. Estes têm sido amplamente utilizados no *screening* de novos compostos inclusive antiepiléticos (JOHNSON; CAREW; SLOMAN, 2007; SELDERSLAGHS et al., 2009; TEIXIDÓ et al., 2012).

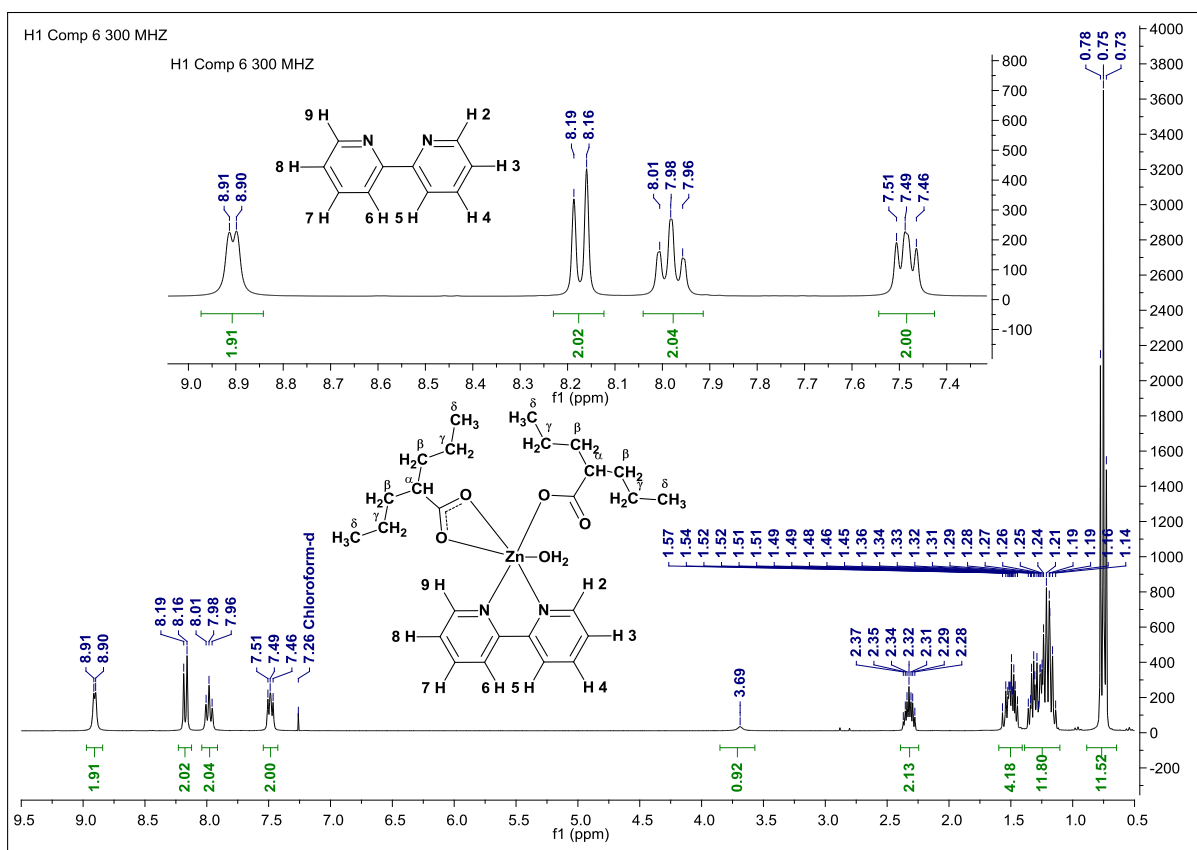


Figura 5. Espectro ¹H RMN do complexo [Zn(Valp)₂Bipi]. Adaptado de Santos (2015).

Sem sombra de dúvida, os complexos organometálicos provocaram alterações morfológicas nos embriões e larvas. As moléculas contendo cobre inibiram a eclosão das larvas com 96 hpf, sendo que o período de eclosão é de 48 hpf. A baixa taxa de eclosão (Tabela 1) pode ser atribuída ao atraso no desenvolvimento de embriões devido a efeitos subletais. Uma hipótese para a alteração na eclosão está na inibição das tetraspaninas, do gene *cdc63*, ou da falta de enzimas proteolíticas secretadas para o amaciamento do córion (PAMANJI et al., 2015). Conforme Hernández (2006), o cobre é responsável por induzir dano nas células da linha lateral e apoptose, além da alteração na eclosão (HERNÁNDEZ et al., 2006).

Além da eclosão, pode-se observar nas larvas a malformação cardíaca, necrose, formação de acúmulo de sangue no saco vitelínico e edema. Denotando efeito

teratogênico dos complexos organometálicos (WEIGT et al., 2012). O composto que apresentou maior concentração letal acumulada ao final do experimento foi [Cu(Valp)₂Bipi] (CL₅₀ = 0,12 µM) seguido pelo complexo [Zn(Valp)₂Bipi] (LC₅₀ = 10µM).

Complexo organometálico	<i>Zebrafish</i> Adulto ^a		Embriões ^b	
	Anticonvulsivante	Mortalidade	Eclosão	Mortalidade
[Cu(Valp) ₂ Fen]				
10	-	+	-	-
30	+	++	-	+
[Cu(Valp) ₂ Bipi]				
10	+++	+	-	+++
30	-	++	-	+++
[Zn(Valp) ₂ Fen]				
10	-	+	++	-
30	++	+	+	-
100	++	-	++	-
[Zn(Valp) ₂ Bipi]				
10	+	+	++	++
30	++	+	+	++
100	+++	-	++	++
Valproato de sódio 175 mM/Kg	++	-	n.t.	n.t.
Controle	-	+	+++	-

Tabela 1. Principais resultados obtidos em *zebrafish* adultos e embriões.

^a *zebrafish* adulto mM/Kg. ^b Concentração dos complexos organometálicos µM.

+ + + = muito alto; + + = alto; + = moderado; - = não detectado. n.t = não tratado.

Apesar taxa de mortalidade elevada em embriões estes mesmos compostos protegeram os peixes adultos frente a convulsão induzida pelo PTZ.

O complexo organometálico [Cu(Valp)₂Bipi] na dose de 10 mM/Kg promoveu maior proteção anticonvulsivante em relação aos demais derivados organometálicos testados e ao fármaco de escolha (valproato de sódio). Assim como o derivado de cobre, o complexo [Zn(Valp)₂Bipi] também desempenhou uma boa atividade anticonvulsivante.

Sabe-se que os íons cobre e zinco desempenham papel fundamental na sinalização molecular do sistema nervoso central, e são liberados nos terminais sinápticos de certos neurônios podem regular a excitabilidade neuronal (MATHIE et al., 2006). Horning (2001) avaliou a influência destes íons na excitabilidade de neurônios do bulbo olfatório de ratos onde pode-se observar que tanto o cobre quanto o zinco contribuem para a modulação diferencial da excitabilidade neuronal através da interação com canais iônicos voltagem-dependentes, como a inibição dos canais de Ca²⁺ sugerindo uma possível atuação na modulação pré-sináptica da liberação de neurotransmissores.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, conseguimos aliar um modelo animal e compostos organometálicos derivados de *valproato* no screening de novas drogas anticonvulsivantes. A partir dos testes observamos:

- Os complexos organometálicos derivados do ácido valproico foram mais efetivos contra as convulsões induzidas por pentilenotetrazol em *zebrafish* do que o valproato de sódio, permitindo tratamentos com doses menores.
- Apesar do complexo $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$ apresentar melhores efeitos anticonvulsivos mas devido aos seus efeitos tóxicos em embriões e larvas indicamos o derivado $[\text{Zn}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$ para estudos futuros em modelos animais mais complexos.
- Os metais cobre (Cu) e zinco (Zn) não alteraram a mortalidade dos embriões, uma vez que só foi possível calcular a concentração letal para os complexos organometálicos contendo bipyridina na fórmula química;
- Por outro lado, ao avaliar a mortalidade através do tempo, os metais influenciaram. Os embriões expostos aos complexos organometálicos contendo Cu apresentaram uma maior mortalidade nas primeiras 24 hpf (horas pós fertilização) e os embriões expostos aos complexos contendo Zn apresentaram mortalidade maior em 72 hpf;
- Os efeitos toxicológicos apresentados não podem ser considerados fatais pois não inviabilizaram o desenvolvimento do embrião em larva;
- O complexo $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Bipi}]$ apresentou maior toxicidade, sendo a concentração letal extremamente baixa quando comparado ao complexo $[\text{Cu}(\text{Valp})_2\text{Fen}]$ e aos derivados de zinco.

6. PERSPECTIVAS

- Buscar metodologias alternativas para a avaliação dos compostos no modelo animal determinando a concentração cerebral complexos organometálicos [Cu(Valp)2Bipy] [Zn(Valp)2Bipy] em peixes.
- Avaliação da eletrofisiologia cerebral de larvas de *zebrafish* expostas aos complexos organometálicos em modelo de convulsão.
- Avaliação da penetração de membrana (BHE).
- Avaliação da toxicidade crônica.
- Continuar a busca de moléculas mais ativas e com menor toxicidade

7. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTAR

ABBOTT LABORATORIES. **Depakene (valproic acid) solution and liquid-filled capsules prescribing information**. [s.l: s.n.].

ALFARO, J. M.; RIPOLL-GÓMEZ, J.; BURGOS, J. S. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. **European Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 7, p. 1252–1255, 2011.

ALI, R.; KHAN, M. A.; SIDDIQUI, N. Past , Present and Future of Antiepileptic Drug Therapy - Finding a Place for Heterocyclics. p. 1024–1050, 2015.

ATKINS, P. **Química Inorgânica**. 3. ed. [s.l.] Bookman, 2003.

AVANZINI, G. Animal models relevant to human epilepsies. **The Italian Journal of Neurological Sciences**, v. 16, n. 1-2, p. 5–8, 1995.

BARABAN, S. C. et al. Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. **Neuroscience**, v. 131, p. 759–768, 2005.

BARABAN, S. C. Modeling Epilepsy and Seizures in Developing Zebrafish Larvae. 2006.

BARBAZUK, W. B. et al. The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. **Genome Research**, v. 10, n. 9, p. 1351–1358, 2000.

BARRY, N. P. E.; SADLER, P. J. Exploration of the medical periodic table: towards new targets. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 49, n. 45, p. 5106–31, 2013.

BAUSH, S. **Animal Models of Epilepsy: Methods and Innovations**. [s.l: s.n.].

BEGHI, E. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs: comparison of two recent guidelines. **The Lancet. Neurology**, v. 3, n. 10, p. 618–21, 2004.

BELCASTRO et al. Metabolic and endocrine effects of valproic acid chronic treatment. **Epilepsy research**, v. 107, n. 1-2, p. 1–8, 2013.

BELCASTRO; STRIANO, P.; PARISI, P. Interictal and periictal headache in patients with epilepsy: Migraine-triggered seizures or epilepsy-triggered headache? **European Journal of Neurology**, v. 20, n. 10, p. 1333–1334, 2013.

BELCASTRO, V.; STRIANO, P. Antiepileptic drugs, hyperhomocysteinemia and B-vitamins supplementation in patients with epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 102, n. 1-2, p. 1–7, 2012.

BELLO-RAMÍREZ, A. M.; CARREÓN-GARABITO, B. Y.; NAVA-OCAMPO, A. A. Do structural properties explain the anticonvulsant activity of valproate metabolites? A QSAR analysis. **Epilepsia**, v. 43, n. 5, p. 475–81, maio 2002.

BERGHMANS, S. et al. Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. **Epilepsy Research**, v. 75, p. 18–28, 2007.

BRANDT, C. et al. Treatment with valproate after status epilepticus: Effect on neuronal damage, epileptogenesis, and behavioral alterations in rats. **Neuropharmacology**, v. 51, n. 4, p. 789–804, 2006.

BRANNEN, K. C. et al. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 89, n. 1, p. 66–77, 2010.

BRUNTON, B. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. 12.

ed. New York: The McGraw-Hill, 2012.

BURTON. On the propyl derivatives and decomposition products of ethyl acetate.

Journal of The American Chemical Society, v. 3, p. 385–95, 1882.

BUTTERWORTH, R. F. Metal Toxicity, Liver Disease and Neurodegeneration.

Neurotoxicity Research, v. 18, n. 1, p. 100–105, 2010.

CALVIN, W. H.; OJEMANN, G. A.; WARD, A. A. Human cortical neurons in

epileptogenic foci: Comparison of inter-ictal firing patterns to those of “epileptic”

neurons in animals. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 34, n.

4, p. 337–351, 1973.

CASINI, A.; MESSORI, L. Molecular Mechanisms and Proposed Targets for Selected

Anticancer Gold Compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. I, p.

2647–2660, 2011.

CHAPMAN, A. et al. OF ANTICONVULSANT OF VALPROATE ACTION. v. 19,

1982.

CHATEAUVIEUX, S. et al. Molecular and therapeutic potential and toxicity of

valproic acid. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2010, 2010.

CHOHAN, Z. H.; SUPURAN, C. T. Organometallic compounds with biologically

active molecules:in vitro antibacterial and antifungal activity of some 1,1’-

(dicarbohydrazono) ferrocenes and their cobalt(II), copper(II), nickel(II) and zinc(II)

complexes. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 19, n. 12, p. 1207–1214, dez.

2005.

CROXFORD, T. P.; MCCORMICK, N. H.; KELLEHER, S. L. Moderate zinc

deficiency reduces testicular Zip6 and Zip10 abundance and impairs spermatogenesis in mice. **The Journal of nutrition**, v. 141, n. 3, p. 359–65, 2011.

DABROWIAK, J. C. Metals in Medicine. **Metals in Medicine**, p. 1–320, 2009.

DE, E. Transtornos mentais associados à epilepsia Mental disorders associated with epilepsy. **Epilepsia**, v. 32, n. 3, p. 170–182, 2005.

EADIE, M. J. Antiepileptic drugs as human teratogens. **Expert opinion on drug safety**, v. 7, n. 2, p. 195–209, 2008.

EHRLICH, P. HOBHOUSE, E. SALYARSAN IN PERNICIOUS ANAEMIA. **The British Medical Journal**, v. 45, p. 1–5, 1912.

ELICEIRI, B. P.; GONZALEZ, A. M.; BAIRD, A. The Blood-Brain and Other Neural Barriers. v. 686, p. 371–378, 2011.

ENGEL, J. ILAE classification of epilepsy syndromes. **Epilepsy research**, v. 70 Suppl 1, p. S5–10, ago. 2006.

FREDERICKSON, C. J.; KOH, J.-Y.; BUSH, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 449–462, 2005.

GRONE, B. P.; BARABAN, S. C. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 339–343, 2015.

HARDEN, C. L. Chapter 11 Antiepileptic Drug Teratogenesis. v. 83, n. 08, p. 205–213, 2008.

HE, J. H. et al. Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 42, n. August, p. 35–42, 2014.

HERNÁNDEZ, P. P. et al. Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). **Hearing Research**, v. 213, n. 1-2, p. 1–10, 2006.

HERRMANN, K. Effects of the Anticonvulsant Drug Valproic Acid and Related Substances on the Early Development of the Zebrafish (*Brachydanio Rerio*). **Toxic. in Vitro**, v. 7, n. 1, p. 41–54, 1993.

HOLLAND, T. C. et al. Acute changes in cellular zinc alters zinc uptake rates prior to zinc transporter gene expression in Jurkat cells. **BioMetals**, 2015.

HORTOPAN, G. A.; DINDAY, M. T.; BARABAN, S. C. Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 3, n. 3-4, p. 144–148, 2010.

HUNT, R. F. et al. A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. **Experimental neurology**, v. 237, n. 1, p. 199–206, 2012.

IBRAHIM, M. et al. Anxiolytic effects of diphenyl diselenide on adult zebrafish in a novelty paradigm. **Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry**, v. 54C, p. 187–194, 2014.

INGHAM, P. W. The power of the zebrafish for disease analysis. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. R1, p. R107–R112, 2009.

JEONG, J.-Y. et al. Functional and developmental analysis of the blood–brain barrier in zebrafish. **Brain Research Bulletin**, v. 75, n. 5, p. 619–628, 2008.

JIRSA, V. K. et al. On the nature of seizure dynamics. **Brain**, v. 137, n. 8, p. 2210–

2230, 2014.

JOHNSON, A.; CAREW, E.; SLOMAN, K. A. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 431–438, 2007.

KARI, G.; RODECK, U.; DICKER, A. P. Zebrafish: An Emerging Model System for Human Disease and Drug Discovery. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 82, n. 1, p. 70–80, 2007.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573–584, 2007.

KIMMEL, C. B. et al. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 203, n. 3, p. 253–310, 1995.

KING, J. C. Zinc: an essential but elusive nutrient. **The American journal of clinical nutrition**, v. 94, n. 2, p. 679S–84S, 2011.

KOWOL, C. R. et al. Mechanisms underlying reductant-induced reactive oxygen species formation by anticancer copper(II) compounds. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 409–423, 2012.

LAM, S. H. et al. Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. v. 24, n. 1, p. 2005–2007, 2006.

LANGER, M. et al. Therapeutic window of opportunity for the neuroprotective effect of valproate versus the competitive AMPA receptor antagonist NS1209 following status epilepticus in rats. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 5-6, p. 1033–47, 2011.

LEMIRE, J. A; HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. **Nature reviews. Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 371–84, 2013.

LI, F. et al. In vitro susceptibility and cellular uptake for a new class of antimicrobial agents: Dinuclear ruthenium(II) complexes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2686–2695, 2012.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease : zebrafish swim into view. v. 8, n. May 2007, p. 353–367, 2010.

LINDER, M. C. et al. Copper transport in mammals. **Hypoxia and Exercise**, v. 448, p. 1–16, 1999.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359–368, 2011a.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359–368, 2011b.

LÖSCHER, W.; DAGMAR, H. Valproate and its major metabolite E-2-en-valproate induce different effects on behaviour and brain monoamine metabolism in rats. v. 299, p. 61–67, 1996.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy research**, v. 50, n. 1-2, p. 3–16, jun. 2002.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Modern antiepileptic drug development has failed to

deliver: Ways out of the current dilemma. **Epilepsia**, v. 52, n. 4, p. 657–678, 2011.

LUSZCZKI, J. J.; ANTKIEWICZ-MICHALUK, L.; CZUCZWAR, S. J. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline enhances the anticonvulsant action of carbamazepine and valproate in the mouse maximal electroshock seizure model. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 2, p. 133–142, 2006.

LUTSENKO, S. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 2, p. 211–217, 2010.

LUTSENKO, S.; BHATTACHARJEE, A.; HUBBARD, A. L. Copper handling machinery of the brain. **Metallomics**, v. 2, n. 9, p. 596, 2010.

MAES, J. et al. Evaluation of 14 Organic Solvents and Carriers for Screening Applications in Zebrafish Embryos and Larvae. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1–9, 2012.

MARIA, R.; SIQUEIRA, P. No Title. 2011.

MARKOSSIAN, K. A; KURGANOV, B. I. Copper chaperones, intracellular copper trafficking proteins. Function, structure, and mechanism of action. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 68, n. 8, p. 827–37, 2003.

MATHIE, A. et al. Zinc and copper: Pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 3, p. 567–583, 2006.

MCGRATH, P.; LI, C. Q. Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 9-10, p. 394–401, 2008.

MEDICI, S. et al. Noble metals in medicine : Latest advances. v. 284, p. 329–350, 2015.

MELO PEREIRA, J. C. et al. Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 9, p. 4180–4187, 2010.

MIRANDA, S. et al. The role of oxidative stress in the toxicity induced by amyloid beta-peptide in Alzheimer's disease. **Prog Neurobiol**, v. 62, n. 6, p. 633–648, 2000.

MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540–63, 2014.

MUSSULINI, B. H. M. et al. Seizures Induced by Pentylenetetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.

NANAU, R. M.; NEUMAN, M. G. Adverse drug reactions induced by valproic acid. **Clinical biochemistry**, v. 46, n. 15, p. 1323–38, out. 2013.

NURGE, M. E.; ANDERSON, C. R.; BATES, E. Metabolic and Nutritional Implications of valproic acid. **Nutrition Research**, v. 11, n. c, p. 949–960, 1991.

OECD. Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages. **OECD Guideline for the Testing of Chemicals**, v. 212, n. 204, p. 1–20, 1984.

OECD. Oecd Guideline for the Testing of Chemicals. v. 2006, n. July, p. 1–11, 2006.

PAMANJI, R. et al. Toxicity effects of profenofos on embryonic and larval development of Zebrafish (*Danio rerio*). v. 9, p. 887–897, 2015.

PAVAN, F. R. et al. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 5099–5107, 2011.

PAVAN, F. R. et al. In Vitro and In Vivo Activities of Ruthenium(II) Phosphine/Diimine/Picolinate Complexes (SCAR) against Mycobacterium tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 1–10, 2013.

PERUCCA, E. Overtreatment in epilepsy : adverse consequences and mechanisms. v. 52, p. 25–33, 2002.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 281–294, 1972.

RICO, E. P. et al. Expression and functional analysis of Na⁺-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. **Brain Research Bulletin**, v. 81, n. 4-5, p. 517–523, 2010.

ROGAWSKI, M. A; LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 553–64, jul. 2004.

ROSEMBERG, D. B. et al. Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19397, 2011.

SANDER, T. The genetics of idiopathic generalized epilepsy: Implications for the understanding of its aetiology. **Molecular Medicine Today**, v. 2, p. 173–180, 1996.

SANTOS, P. R. et al. Synthesis, structural characterization and previous cytotoxicity assay of Zn(II) complex containing 1,10-phenanthroline and 2,2'??-bipyridine with valproic acid. **Polyhedron**, v. 90, p. 239–244, 2015.

SARKISIAN, M. R. Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and

Epileptic Disorders. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 2, n. 3, p. 201–216, jun. 2001.

SELDERSLAGHS, I. W. T. et al. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 308–320, 2009.

SHORVON, S. D. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: The second 50 years, 1959-2009. **Epilepsia**, v. 50, p. 93–130, 2009.

SIERRA, S. et al. Administration of docosahexaenoic acid before birth and until aging decreases kainate-induced seizures in adult zebrafish. **Brain Research Bulletin**, v. 88, n. 5, p. 467–470, 2012.

SIPES, N. S.; PADILLA, S.; KNUDSEN, T. B. Zebrafish-As an integrative model for twenty-first century toxicity testing. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 93, n. 3, p. 256–267, 2011.

SONG, Y. et al. Zinc transporter expression profiles in the rat prostate following alterations in dietary zinc. **BioMetals**, v. 23, n. 1, p. 51–58, 2010.

SPRECKELMEYER, S.; ORVIG, C.; CASINI, A. Cellular Transport Mechanisms of Cytotoxic Metallodrugs: An Overview beyond Cisplatin. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 15584–15610, 2014.

SYLLA-IYARRETA VEITÍA, M. et al. Synthesis, structural analysis and anticonvulsant activity of a ternary Cu(II) mononuclear complex containing 1,10-phenanthroline and the leading antiepileptic drug valproic acid. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1286–1293, 2009a.

SYLLA-IYARRETA VEITÍA, M. et al. Synthesis, structural analysis and

anticonvulsant activity of a ternary Cu(II) mononuclear complex containing 1,10-phenanthroline and the leading antiepileptic drug valproic acid. **Biochimie**, v. 91, n. 10, p. 1286–93, out. 2009b.

TATIANA AFRIKANOVA, ANN-SOPHIE K. SERRUYS, ESGUERRA, AND C. V. **Validation of the Zebrafish Pentylenetetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs**, 2012.

TEIXIDÓ, E. et al. Assessment of developmental delay in the zebrafish embryo teratogenicity assay. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 469–478, 2012.

THOMPSON, K. H.; ORVIG, C. Boon and bane of metal ions in medicine. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5621, p. 936–939, 2003.

TOMSON, T. et al. Valproate in the treatment of epilepsy in girls and women of childbearing potential. **Epilepsia**, v. 56, n. 7, p. 1006–1019, 2015.

TOMSON, T.; BATTINO, D. Teratogenic effects of antiepileptic drugs. p. 803–813, 2012.

TON, C.; LIN, Y.; WILLETT, C. Zebrafish as a model for developmental neurotoxicity testing. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 76, n. 7, p. 553–567, 2006.

TUREL, I. Special Issue: Practical Applications of Metal Complexes. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 7951–7956, 2015.

VAN DER LAAN, J. W. et al. Testing strategies for embryo-fetal toxicity of human pharmaceuticals. Animal models vs. in vitro approaches: a workshop report. **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 63, n. 1, p. 115–23, 2012.

WHO. **Media centre Epilepsy.** Disponível em:
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/#>>. Acesso em: 5 maio. 2015.

WILLNER, P. Animal models as simulations of depression. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 4, p. 131–136, 1991.

WYLER, A R.; OJEMANN, G. A; WARD, A A. Neurons in human epileptic cortex: correlation between unit and EEG activity. **Annals of neurology**, v. 11, n. 3, p. 301–8, 1982.

ZHAO, Y. et al. The in vivo underlying mechanism for recovery response formation in nano-titanium dioxide exposed *Caenorhabditis elegans* after transfer to the normal condition. **Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine**, v. 10, n. 1, p. 89–98, jan. 2014.