



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-BIOQUÍMICA**

**INIBIÇÃO DA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO PELO DISSELENETO DE  
DIFENILA: ALTERAÇÕES NO IMUNOCONTEÚDO DOS  
TRANSPORTADORES DE GLUTAMATO E PROTEÍNAS SINÁPTICAS**

**Ana Paula Ardais**

**Porto Alegre, 2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-BIOQUÍMICA**

**INIBIÇÃO DA CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO PELO DISSELENETO DE DIFENILA:**  
**ALTERAÇÕES NO IMUNOCONTEÚDO DOS TRANSPORTADORES DE**  
**GLUTAMATO E PROTEÍNAS SINÁPTICAS**

Mestranda: Ana Paula Ardais

Orientadora: Profa. Dra. Lisiane de Oliveira Porciúncula

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas:  
Bioquímica, como requisito para obtenção  
do grau de Mestre em Bioquímica.

**Porto Alegre, 2009**

*Dedico este trabalho a dois grandes guerreiros: Seu Amadeu e Dona Cleusa, meus Mestres da vida.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer imensamente a minha maravilhosa, linda e unida família que sempre me apoiou e acreditou em mim. Pai e mãe, sem vocês nada disso teria acontecido. Muito obrigada por todos os ensinamentos e por toda a confiança depositada em mim. Mano, pelas palavras de incentivo, nas horas certas. Mimi, minha maninha emprestada por dividir comigo minhas angústias e alegrias, e ao Murilinho, o melhor acontecimento, que tornou meus os dias bem mais divertidos e inspiradores. Nossa união foi fundamental para que este sonho se realizasse. Amo muito todos vocês!!!!

Lisi, minha orientadora e amiga, muito obrigada por toda a confiança, por ter me aceito pra trabalhar contigo sem conhecer direito meu trabalho. Por todos os ensinamentos, puxões de orelha e conversas divertidas que em muito alegraram meus dias no laboratório.

Ao Professor João Batista, o grande responsável pelo meu despertar científico e pela minha vinda para Porto Alegre. Muito obrigada, por todo o apoio (inclusive o apoio técnico) e pelo disseleneto liiiiiiiiiindo de morrer que permitiu que este trabalho pudesse seguir adiante.

Ao Professor Diogo, que me recebeu em seu laboratório de braços abertos e com um sorriso contagiante no rosto. Ao professor Luiz Valmor, o Roska, por tornar o trabalho bem mais divertido.

Dani, minha colega e amiga, muito obrigada por toda a paciência, por sempre estar disposta a me ajudar e por me acalmar nos momentos de estresse e tristeza quando o trabalho não dava certo. Bina, muito obrigada por estar sempre por perto, me ajudando aqui e ali quando eu precisava. Ao incansável Marcelo Costa, pelos finais de semana cedidos ao trabalho. Ao Paulete, sempre ali, disposto a ajudar em tudo que fosse preciso. A Fêzinha, pelo papel fundamental na finalização deste trabalho. Muito Obrigada a todos vocês por fazerem parte da minha vida e tornarem os meus dias mais alegres e menos cansativos.

Ao Giordano pelo ajuda nos experimentos de imunoistoquímica e pela parceria na hora de tomar umas cervejinhas. Ao Guilherme por ter disponibilizado seu tempo para ajuda nos experimentos de estresse oxidativo e ao Prof. Fabio e Zé Cláudio pela disponibilidade de seus laboratórios.

A todos os colegas dos laboratórios 26 e 28. Todos tão importantes e que de alguma forma participaram do meu trabalho, muito obrigada!

Um agradecimento muito especial as flowers do lab, Cati e Ju pela grande amizade que construímos, pelas conversas, pelas noites de trabalho, né Cati?!

Aos responsáveis pelo ratário, por cuidarem dos nossos animais.

A Cléia pela paciência e eficiência em resolver nossos problemas.

Muito obrigada a todos os amigos que de alguma forma contribuíram para que isto tudo se concretizasse. São tantos que não cabe citar, todos sabem o quão importante foram e são!!!

**MUITO OBRIGADA!**

*“Mesmo quando tudo pede um pouco mais de calma*

*Até quando o corpo pede um pouco mais de alma*

*A vida não pára*

*Enquanto o tempo acelera e pede pressa*

*Eu me recuso faço hora vou na valsa*

*A vida é tão rara*

*Enquanto todo mundo espera a cura do mal*

*E a loucura finge que isto tudo é normal*

*Eu finjo ter paciência*

*O mundo vai girando cada vez mais veloz*

*A gente espera do mundo e o mundo espera de nós*

*Um pouco mais de paciência...”*

*Lenine*

## SUMÁRIO

### Capítulo I. Introdução

I.1– Selênio	02
I.1.1 – Histórico	02
I.1.2 - Selênio em Sistemas Biológicos	03
I. 1.3 - Disseleneto de Difenila	05
I.1.3.1 – Propriedades Farmacológicas e Toxicológicas	05
I.2 - Sistema Glutamatérgico	07
I.2.1 - Transmissão Sináptica Glutamatérgica	07
I.2.1.1 – Transportadores de Glutamato	09
I.2.1.1.1 – Estado Redox e o Transporte de Glutamato	12
I.2.1.2 - Proteína Ácida Fibrilar Glial	13
I.2.1.3 – Proteínas Pré-sinápticas	14
I.3 - Objetivos	16

### Capítulo II – Artigo Científico

Ana Paula Ardais, Giordano Gubert Viola, Marcelo Silveira da Costa, Fernanda Nunes, Guilherme Antonio Behr, Fábio Klamt, José Claudio Fonseca Moreira, Diogo Onofre de Souza, Joao Batista Teixeira da Rocha, Lisiane de Oliveira Porciúncula. <b>Inhibition of glutamate uptake into rat hippocampal slices by diphenyl diselenide involves modification on vesicular glutamate transporter 1, SNAP-25 and GFAP immunocontent.</b>	18
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo III. Discussão Geral	52
-------------------------------	----

Capítulo IV. Conclusões	58
-------------------------	----

Capítulo V. Perspectivas	61
--------------------------	----

Capítulo VI. Referências Bibliográficas	63
-----------------------------------------	----

## RESUMO

A descoberta do papel essencial do selênio no centro ativo da enzima antioxidante glutathiona peroxidase despertou o interesse científico por este elemento, que até então tinha sua toxicidade como o único alvo de estudos biológicos. Muitas propriedades farmacológicas foram descobertas a partir de então, e isto motivou a síntese de compostos orgânicos de selênio que apresentassem menor toxicidade e maior potencial terapêutico. Nesta busca, o disseleneto de difenila,  $(\text{PhSe})_2$ , tem merecido destaque desde a década de 80 principalmente por ser um mimético da enzima glutathiona peroxidase. Estudos têm revelado que além de antioxidante, este composto possui propriedades neuroprotetoras, antiinflamatórias e antiúlcera. No entanto, sua habilidade em oxidar proteínas sulfidrílicas lhe confere características tóxicas. Alterações importantes causadas por este composto sobre o sistema glutamatérgico vêm sendo relatadas. Entretanto, estudos que avaliem mecanismos moleculares da ação do  $(\text{PhSe})_2$  sobre o sistema nervoso central ainda estão sendo investigados. Neste trabalho, a administração aguda de  $(\text{PhSe})_2$  pela via oral causou uma inibição na captação de glutamato em fatias de hipocampo. Mecanismos moleculares foram avaliados na tentativa de compreender como este composto atua sobre a neurotransmissão glutamatérgica. O efeito do  $(\text{PhSe})_2$  sobre o imunoconteúdo de todos os transportadores de glutamato mostrou, de um modo geral, que este composto orgânico de selênio pode afetar a neurotransmissão glutamatérgica por alterar o imunoconteúdo dos transportadores de glutamato. Seus efeitos sobre a captação de glutamato foram atribuídos a uma redução no imunoconteúdo de GFAP e do transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1), associados a uma redução no imunoconteúdo da SNAP-25. Estes resultados demonstram que os efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  atingem tanto os terminais nervosos quanto as células gliais, ambos responsáveis pela remoção do glutamato extracelular. O transportador neuronal EAAC1 e o glial GLAST tiveram seus imunoconteúdos aumentados, o que nos leva a sugerir um mecanismo compensatório condicionado por estes transportadores com o objetivo de reduzir os níveis de glutamato extracelulares. O possível envolvimento das espécies reativas de oxigênio no efeito inibitório da captação de glutamato também foi testado. Entretanto, como nenhuma alteração foi encontrada a influência do estresse oxidativo sobre a inibição da captação poderia ser descartada pelo menos nas doses e via de administração testadas neste trabalho.

## ABSTRACT

The essential role of selenium was firstly described as the active center of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. Since then, the biological research have been increased specially concerning the pharmacological properties, which lead to the synthesis of new organo seleno compounds that present lower toxicity and higher therapeutic potential. In this way, diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> has deserved attention since the 80's, mainly because it is a glutathione peroxidase-mimetic. Besides the antioxidant activity, some studies have shown that this compound has neuroprotector, anti-inflammatory and anti-ulcer properties. Its ability to oxidize sulphhydryl proteins has been shown to be the major mechanism for toxicity. Recently, it was reported that (PhSe)<sub>2</sub> administered in rodents was able to modify some parameters of glutamatergic system. However, studies that evaluate molecular mechanisms of (PhSe)<sub>2</sub> action on central nervous system were not quite elucidated. In this work, oral acute administration of (PhSe)<sub>2</sub> caused an inhibition on glutamate uptake in hippocampal slices. Molecular mechanisms were evaluated for understanding how this compound acts on glutamatergic neurotransmission. Altogether, the effect of (PhSe)<sub>2</sub> on immunoccontent of all glutamate transporters showed that this organo seleno compound altered the immunoccontent of glutamate transporters. Its effects on glutamate uptake were attributed by a reduction on *glial fibrillar acid protein* (GFAP) and *vesicular glutamate transporter 1* (VGLUT1) immunoccontent, associated with a reduction on SNAP-25 immunoccontent. These results demonstrate that (PhSe)<sub>2</sub> affect terminal nerves and also glial cells, both responsible by removing extracellular glutamate. On the other hand, the neuronal (EAAC1) and glial (GLAST) transporters presented and increase in their immunoccontent by the treatment with (PhSe)<sub>2</sub>, which may suggest a compensatory mechanism conditioned by these transporters in order to reduce the extracellular glutamate levels. The possible involvement of oxygen reactive species in inhibitory effect of glutamate uptake was also tested. Because no alterations were found, the influence of oxidative stress on inhibition glutamate uptake could be discarded, at least in doses and administration route tested in this work.



## LISTA DE FIGURAS

### I - INTRODUÇÃO

- Figura 1-** Estrutura química do disseleneto de difenila – (PhSe)<sub>2</sub>.....06
- Figura 2-** Terminal nervoso pré-sináptico de uma sinapse axodendrítica glutamatérgica e espinha dendrítica pós-sináptica.....11
- Figura 3-** Localização das proteínas envolvidas na liberação vesicular de neurotransmissores.....15

### II- ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1-** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> acute administration on glutamate uptake in hippocampal slices of adult rats.....44
- Figura 2-** Representative and quantitative Western blotting analysis of the hippocampal glial (GLAST and GLT1) transporters immunocontent from control and (PhSe)<sub>2</sub>-treated.....45
- Figura 3-** Representative and quantitative Western blotting analysis of the hippocampal neuronal (EAAC1) and vesicular (VGLUT1) transporters immunocontent from control and (PhSe)<sub>2</sub>-treated.....46
- Figura 4-** Representative and quantitative Western blotting analysis of the hippocampal *glial fibrillar acid protein* (GFAP) and *synaptosomal-associated protein 25* (SNAP-25) immunocontent from control and (PhSe)<sub>2</sub>-treated.....47
- Figura 5-** Representative and quantitative immunohistochemistry analysis of *glial fibrillar acid protein* (GFAP) from hippocampal CA1, CA3, fimbria and dentate gyrus regions from control and (PhSe)<sub>2</sub>-treated.....48

**Figura 6-** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> acute administration on endogenous antioxidant defenses in hippocampus of adult rats. Were evaluated the catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (Gpx) activities from control and (PhSe)<sub>2</sub>-treated.....**49**

**Figura 7-** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> acute administration on oxidative damage parameters in hippocampus of adult rats. Were determined carbonyl protein levels, *tiobarbituric acid reative species* (TBARS) formation and non-protein thiol groups (NPSH) content from control and (PhSe)<sub>2</sub>-treated.....**50**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AMPA**-  $\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico

**EAAC1**-carreador de aminoácido excitatório 1 (do inglês “*Excitatory Amino Acid Carrier*”)

**EAAT 1-5**-transportador de aminoácido excitatório 1-5 (do inglês, “*Excitatory Amino Acid Transporter 1-5*”)

**GABA<sub>A</sub>R**-receptor ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**GLAST**-transportador de glutamato-aspartato

**GFAP**-*glial fibrillary acidic protein*

**GLT1**-transportador de glutamato 1 (do inglês, “*Glutamate Transporter*”)

**GSH**-glutathiona reduzida

**H<sup>+</sup>V-ATPase**- bomba vesicular de íons hidrogênio

**IGluR**- receptores de glutamato ionotrópicos

**KA**-ácido caínico

**LPS**- lipopolissacarídeo

**MGluR**- receptores de glutamato metabotrópicos

**NMDA**-N-metil-D-aspartato

**(PhSe)<sub>2</sub>**- disseleneto de difenila

**PTZ**-pentilenotetrazol

**R-SeH**- grupamento selenol

**R-SH**- grupamento tiol

**SNAP-25**- *synaptosomal-associated protein-25*

**SNARE**-*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*

**VAMP 1 e 2**- sinaptobrevina 1 e 2

**VGLUT 1,2 e 3**-transportador vesicular de glutamato 1,2 e 3 (do inglês, Vesicular Glutamate Transporter).

## **APRESENTAÇÃO**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual encontra-se no item **ARTIGO CIENTÍFICO**.

Os itens **DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários sobre o artigo científico contido neste trabalho.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO GERAL** desta tese.

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

# I – INTRODUÇÃO

## I.1.- Selênio

### I.1.1.- Histórico

Em 1817, ao visitar uma fábrica de ácido sulfúrico, o químico sueco Jöns Jacob Berzelius observou um líquido pardo avermelhado que ao ser aquecido com maçarico, desprendia um odor fétido. O resultado das investigações sobre este material levou a descoberta do Selênio. Este elemento pertencente ao grupo 16 da tabela periódica é irregularmente distribuído na crosta terrestre, sendo encontrado em rochas sedimentares das regiões mais áridas. Ele apresenta-se em três formas alotrópicas incluindo selênio cinza, vermelho e preto e nos seguintes estados de oxidação: selênio elementar ( $\text{Se}^0$ ), selenito ( $\text{Se}^{+4}$ ), selenato ( $\text{Se}^{+6}$ ) e seleneto ( $\text{Se}^{-2}$ ).

Raramente encontrado em sua forma elementar, o selênio é obtido principalmente como um subproduto da refinação do cobre, sendo a produção comercial realizada pela queima dos lodos com cinzas de soda ou adição de ácido sulfúrico. O selênio, assim como seus derivados, é utilizado em alguns aparelhos fotográficos, plásticos, tintas, xampus anticaspas, suplementos de vitaminas e minerais, fungicidas, e certos tipos de vidros. Entretanto, é considerado um elemento perigoso para o meio ambiente, fazendo-se necessário o seu armazenamento em locais secos evitando, dessa forma, infiltrações que contaminem as águas. No século XIII, Marco Polo descreveu a intoxicação de animais que se alimentavam com plantas da região de Succuir, na China. Posteriormente, fez-se a relação de uma doença que acometia animais de fazendas nos EUA, denominada “*alkali disease*”, com os relatos prévios de Marco Polo, diagnosticando-se a intoxicação por selênio, decorrente da ingestão de plantas que acumulam grandes quantidades deste elemento absorvendo-o do solo (Spallholz, 1993).

Durante muito tempo a toxicidade causada pelos altos níveis deste elemento foi o único alvo de estudos biológicos (Levander e Burk, 1994), uma vez que a sua importância nutricional só foi reconhecida por Schwartz & Foltz que em 1957, identificaram o selênio como um micronutriente para todas as formas de vida. Atualmente, a deficiência deste elemento tem sido apontada como uma das causas principais de algumas patologias envolvendo o sistema cardiovascular, estando também associada ao progresso de distúrbios neurológicos e de humor, infecções virais e câncer (Ge e Yang, 1993; Benton, 2002; Beck et al., 2003; Navsariwala et al., 2006; Hill et al., 2004). Na forma de selenocisteína, o selênio é um constituinte do sítio ativo de muitas enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase, tioredoxina redutase e selenoproteína P (Flohé et al., 1973; Holmgren, 1985; Ursini et al., 1990). Neste contexto, a descoberta das propriedades farmacológicas de compostos orgânicos de selênio, e também a menor toxicidade em relação as espécies inorgânicas, tem despertado interesse pela síntese de novos compostos orgânicos que apresentem potencial terapêutico.

### **I.1.2 – O selênio em sistemas biológicos**

O selênio entra na cadeia alimentar pelas plantas que o absorvem do solo. Sua importância como elemento essencial na dieta foi reconhecida após a descoberta da doença de Keshan, uma cardiopatia infantil com alta incidência em algumas regiões da China onde o solo é extremamente pobre em selênio (Ge e Yang, 1993). Este elemento compartilha propriedades químicas e físicas com o enxofre e esta similaridade permite que o selênio substitua o enxofre, promovendo interações selênio-enxofre nos sistemas biológicos. Por outro lado, as diferenças nas propriedades físico-químicas entre estes elementos constituem a base de seus papéis biológicos específicos (Stadtman, 1980). Os

selenóis (R-SeH) são as formas correspondentes aos tióis (R-SH), onde ocorre a substituição do átomo de enxofre pelo átomo de selênio (Klayman e Günther, 1973). O consumo diário de selênio varia de 100 a 200 µg/ dia, podendo ser encontrado nos seguintes alimentos: castanha-do-pará, alho, cebola, brócolis, cogumelos, cereais, pescados, ovos e carnes (Dumont et al., 2006; Reilly, 1996). As espécies de selênio estão distribuídas no organismo em diferentes órgãos, sendo que grandes quantidades deste elemento estão presentes em ordem de concentração: nos rins, fígado, baço, músculo cardíaco, pulmão e cérebro (Dumont et al., 2006). Uma redução nos níveis de selênio no cérebro pode causar vários distúrbios neurológicos, sendo este órgão um dos mais susceptíveis ao estresse oxidativo pela carência de enzimas antioxidantes como a catalase (Switala and Loewen, 2002). Sendo assim, os produtos da peroxidação de lipídios precisam ser removidos por selenoproteínas, como a glutathione peroxidase, que contem selênio como parte de seu sítio ativo. Alguns estudos demonstraram a importância do selênio sobre a atividade cerebral. A carência de selênio leva a um estado de humor mais deprimido (Hawkes & Hornbostel, 1996) e, mesmo em quantidades limitadas, observa-se um aumento na incidência de depressão e outros sintomas negativos do estado de humor como ansiedade, confusão e hostilidade (Benton & Cook, 1991; Hawkes & Hornbostel, 1996; Finley & Penland, 1998).

Assim, a descoberta do papel essencial do selênio no centro ativo da enzima glutathione peroxidase (Rotruck et al., 1973) e o avanço do conhecimento sobre o papel fisiológico do selênio na regulação do dano oxidativo (Cadenas & Sies, 1985; Ursini & Brindoli, 1987), aumentou o interesse de compostos orgânicos contendo selênio que possuam propriedades biológicas e aplicações farmacológicas (Parnham & Graf, 1991). Além de atuarem como antioxidantes, os compostos orgânicos de selênio também apresentam propriedades antiinflamatórias por reduzir hidroperóxidos intermediários



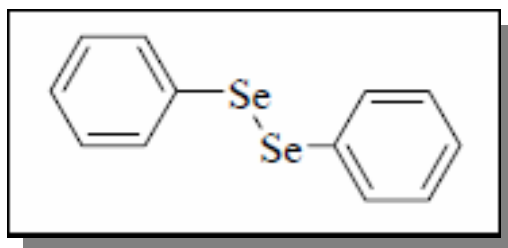
formados na via da ciclooxigenase e lipoxigenase diminuindo a produção de prostaglandinas e leucotrienos (Spallholz et al., 1990; Rayman, 2000; Nogueira et al., 2002).

### **I.1.3 - Disseleneto de difenila - (PhSe)<sub>2</sub>**

#### **I.1.3.1 - Propriedades farmacológicas e toxicológicas**

Os compostos orgânicos de selênio podem substituir o enxofre nos grupamentos tiólicos das cisteínas, ditiotreitól e glutathiona reduzida (GSH) originando selenocisteínas, selenóis e dissulfetos (Walter et al., 1972). Vários relatos têm demonstrado atividade antioxidante de compostos orgânicos de selênio em diferentes modelos experimentais, tanto ao reagir com hidroperóxidos como com peroxinitritos (Andersson et al., 1994; Meotti et al., 2004; Roussyn et al., 1996).

O composto disseleneto de difenila, (PhSe)<sub>2</sub> (Figura 1), tem merecido destaque na literatura desde a década de 80 principalmente por ser um mimético da enzima glutathiona peroxidase (Wilson et al., 1989). Neste contexto, diversos trabalhos têm apresentado o (PhSe)<sub>2</sub> como um bom agente antioxidante na redução da peroxidação de lipídios provocada por diversos agentes e em diferentes tecidos (Meotti et al., 2004; Santos et al., 2004; 2005; Posser et al., 2006). Dados da literatura também indicam que esse composto orgânico de selênio apresenta várias propriedades farmacológicas, tais como anti-úlceras (Savegnago et al., 2006), neuroprotetor (Ghisleni et al., 2003), hepatoprotetor (Borges et al., 2005; 2006), anti-hiperglicemiante (Barbosa et al., 2006) e também protege contra a discinesia orofacial induzida por reserpina e haloperidol (Burger et al., 2004, 2006). Além disso, Rosa et al., (2007) demonstraram que o (PhSe)<sub>2</sub> administrado em camundongos aumenta o desempenho em tarefas de aprendizado e memória sem causar neurotoxicidade.



**Figura 1.** Estrutura química do disseleneto de difenila – (PhSe)<sub>2</sub>.

No entanto, apesar da sua atividade como mimético da glutathiona peroxidase, que protege as membranas celulares da peroxidação lipídica, bem como a sua ação anti-inflamatória, os compostos orgânicos de selênio podem também oxidar proteínas sulfidrílicas, evento que seria responsável pela sua toxicidade (Nogueira et al., 2004).

O potencial tóxico do (PhSe)<sub>2</sub> tem sido sugerido pela administração de altas doses tanto de forma crônica como aguda que levaram a sua deposição no fígado, rim e cérebro (Jacques-Silva et al., 2001; Maciel et al., 2003). O efeito agudo da toxicidade por (PhSe)<sub>2</sub> também foi observado pela sua habilidade em provocar convulsões em camundongos, que foram prevenidas pela administração de agonistas e moduladores alostéricos do sistema GABAérgico (Nogueira et al., 2003). Altas doses desse composto orgânico de selênio também aumentaram o limiar de indução de convulsões por pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista de receptores do tipo GABA<sub>A</sub>, que culminou numa maior incidência de morte nesses animais (Brito et al., 2006). Por meio desses estudos se pode observar que (PhSe)<sub>2</sub> é, de fato, capaz de desencadear danos cerebrais em camundongos.

No que diz respeito a alterações em sistemas de neurotransmissão importantes para o funcionamento do sistema nervoso central, observou-se que o composto (PhSe)<sub>2</sub> altera parâmetros do sistema glutamatérgico em cérebro de ratos. De fato, o (PhSe)<sub>2</sub> diminuiu a união de glutamato e seu antagonista MK-801 em membranas preparadas de

animais tratados com esse composto e em experimentos *in vitro* (Nogueira et al., 2001) bem como em ensaios com plaquetas humanas (Borges et al., 2004). Além disso, o  $(\text{PhSe})_2$  inibiu a captação de glutamato por vesículas sinápticas e fatias de córtex cerebral (Nogueira et al., 2002; Moretto et al., 2007). Estes resultados indicam que a administração de  $(\text{PhSe})_2$  é capaz de alterar sistemas de neurotransmissão importantes para o funcionamento do sistema nervoso central tais como o glutamatérgico.

## **I.2 – Sistema Glutamatérgico**

### **I.2.1 – Transmissão sináptica glutamatérgica**

As principais vias excitatórias do sistema nervoso central utilizam glutamato como neurotransmissor (Ozawa et al., 1998; Meldrum et al., 1999). O glutamato é encontrado no cérebro de mamíferos em altas concentrações (10 mM) e participa de funções metabólicas idênticas as exercidas em outros tecidos (Meldrum et al., 1999). Está envolvido em vários processos fisiológicos, tais como cognição, aprendizado, memória e formação de redes neurais durante o desenvolvimento (Izquierdo & Medina, 1997; Ozawa et al., 1998; Castellano et al., 2001).

Este aminoácido é sintetizado nos terminais pré-sinápticos, predominantemente a partir da glutamina devido à ação da enzima glutaminase, mas pode provir também do  $\alpha$ -cetogluturato, via glutamato desidrogenase e  $\alpha$ -cetogluturato desidrogenase (Kvamme, 1998). Após ser liberado para o espaço extracelular, o glutamato exerce suas funções pela ativação de receptores presentes nas membranas pré e pós-sinápticas. Estes receptores estão categorizados em duas classes distintas: receptores ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos (iGluR) são assim denominados, pois são canais que permitem a passagem de um cátion específico quando ativados por um agonista (Ozawa et al., 1998) e foram subdivididos em N-metil-D-aspartato (NMDA),

$\alpha$ -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol-ácido propiônico (AMPA) e ácido caínico (KA), de acordo com a sensibilidade a estes agonistas. Os receptores metabotrópicos (mGluR) pertencem a uma família de receptores que estão acoplados às proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina (proteínas G), promovendo então a modulação de efetores intracelulares que por sua vez ativam e/ou inibem diversos eventos de transdução de sinal (Conn e Pin, 1997; Osawa et al., 1998).

A ação excitatória do glutamato é finalizada pela sua remoção da fenda sináptica predominantemente por transportadores específicos localizados nas células gliais. Entretanto, a expressão de alguns transportadores presentes nas células gliais podem ser encontrados nas membranas pré-sinápticas dos neurônios. A captação do glutamato da fenda sináptica envolve dois sistemas de transporte: um carreador com alta afinidade dependente de  $\text{Na}^+$ , localizado nas membranas pré-sinápticas e gliais (Robinson & Dowd, 1987) e outro com baixa afinidade e independente de  $\text{Na}^+$ , nas membranas das vesículas sinápticas (Fykse & Fonnum, 1996). Os transportadores presentes nas membranas dos astrócitos são os responsáveis pela remoção da maior parte do glutamato presente na fenda sináptica (Schousboe, 1981). Devido à ação coordenada destes transportadores, o glutamato após ser removido da fenda sináptica é transportado na forma de glutamina para o meio extracelular onde o neurônio capta glutamina e reconverte em glutamato no meio intracelular pela ação da enzima glutaminase. Atualmente observou-se que os astrócitos também apresentam vesículas sinápticas (Bezzi et al., 2004) que seriam responsáveis pela exocitose do glutamato. A captação de glutamato é responsável direta pela manutenção de altos níveis de precursores de glutamato e baixas concentrações extracelulares deste neurotransmissor (Dichter & Wilcox, 1997).

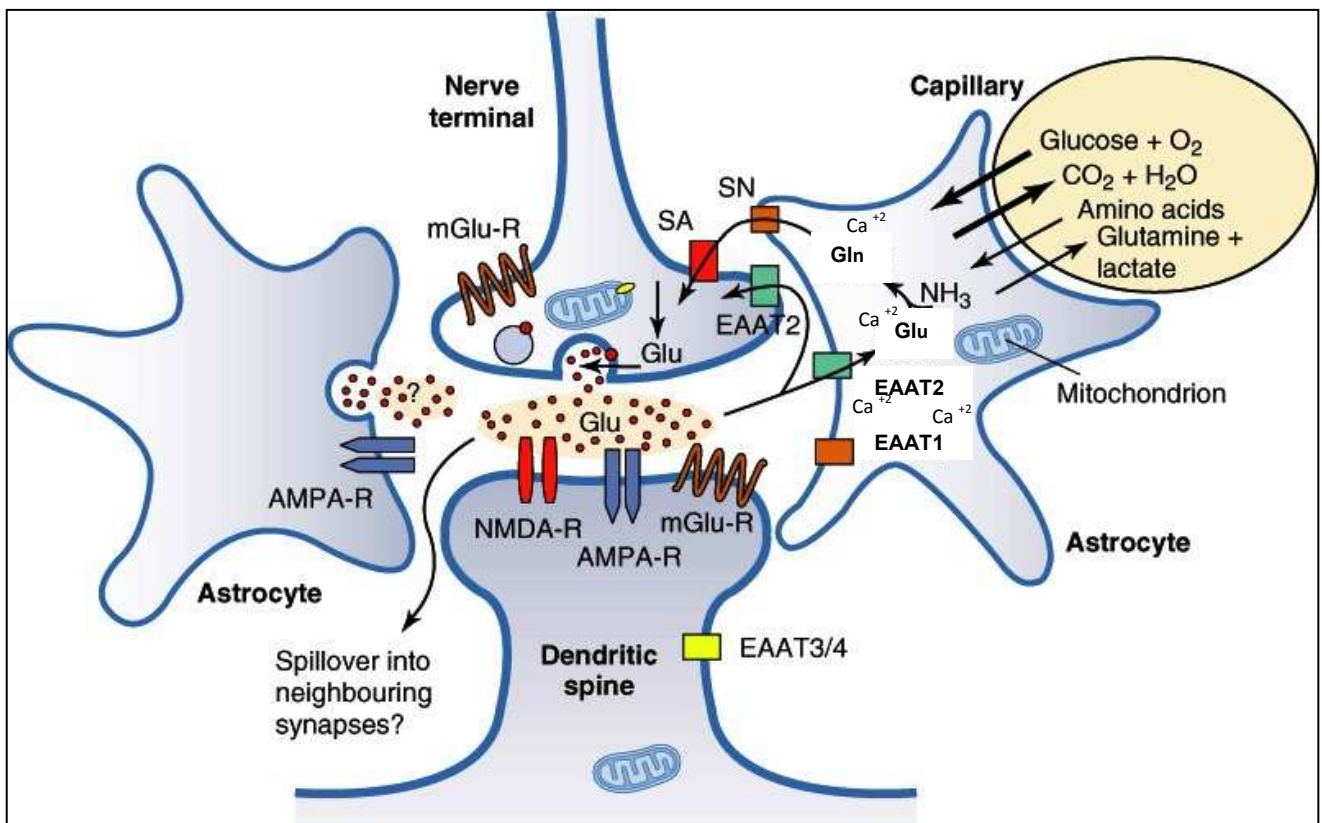
O glutamato, como mediador de sinapses excitatórias, tem um papel fundamental em funções essenciais do sistema nervoso central; no entanto, um aumento nas concentrações de glutamato na fenda sináptica leva à estimulação excessiva dos receptores glutamatérgicos, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares que incluem aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, diminuição nos níveis de enzimas antioxidantes e maior influxo de cálcio e sódio, podendo provocar danos celulares que culminam na morte neuronal (Forder and Tymianski, 2009; Singh et al., 2003; Lipton e Rosenberg, 1994; Olney, 1978; Price, 1999). Alguns estudos têm demonstrado que o tratamento com compostos de selênio restabelece o nível e a atividade de enzimas antioxidantes, reduzindo a peroxidação de lipídeos e prevenindo a morte celular em modelos de toxicidade pelo glutamato e seus agonistas (Porciúncula et al., 2001; Savaskan et al., 2003).

### **1.2.1.1 – Transportadores de Glutamato**

Atualmente, cinco subtipos de transportadores de glutamato foram caracterizados: em roedores *glutamate-aspartate transporter* (GLAST) e seu equivalente em humanos *excitatory amino acid transporter* (EAAT1), *glutamate transporter I* (GLT1) e em humanos (EAAT2), que são expressos predominantemente em astrócitos. GLAST é o principal transportador presente durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (Furuta et al, 1997), enquanto o GLT1 é responsável por 90% de todo o transporte nos tecidos adultos (Tanaka et al., 1997). Estes dois transportadores são quantitativamente os principais transportadores de glutamato, sendo responsáveis pela maior parte da sua remoção da fenda sináptica (Anderson & Swanson, 2000). Outro subtipo de transportador é o *excitatory aminoacid carrier 1* (EAAC1) ou *excitatory aminoacid transporter 3* (EAAT3), que é encontrado predominantemente em neurônios (Conti et al., 1998; Torp et al., 1997), sendo expresso no compartimento

somatodendrítico, possivelmente extra-sináptico (Coco et al., 1997). No entanto, este transportador não é restrito a neurônios, sendo encontrado também nas membranas dos astrócitos (Conti et al., 1998). Esse transportador diferentemente dos transportadores astrocitários não é o principal responsável pela remoção do glutamato no meio extracelular. Ao invés disso, recente estudo demonstrou que a função desse transportador seria a captação de cisteína para a síntese de glutathione pelos neurônios (Aoyama et al., 2006). O quarto subtipo, *excitatory aminoacid transporter 4* (EAAT4), é encontrado nas células de Purkinje (Dehnes et al., 1998) e o *excitatory aminoacid transporter 5* (EAAT5), é presente na retina de mamíferos (Arriza et al., 1997; Danbolt, 2001).

Por fim, cabe citar a existência dos transportadores vesiculares de glutamato, VGLUTs 1-3, que estão localizados nas membranas das vesículas sinápticas (Fykse and Fonnum, 1996; Hisano, 2003). As vesículas sinápticas (Figura 2) são organelas de aproximadamente 40 nm, que possuem uma diversidade surpreendente de proteínas essenciais para o tráfego de membrana e captação de neurotransmissores (Takamori et al., 2006). O sistema de transporte vesicular do glutamato é independente de sódio e está acoplado a ação de uma próton ATPase ( $H^+$ -ATPase) que forma um gradiente de prótons durante o processo de captação do neurotransmissor. Este sistema de transporte conta com complexos protéicos localizados na chamada zona ativa e responsáveis pelo ancoramento e fusão das vesículas à membrana pré-sináptica.



Fonte: Basic Neurochemistry, Capítulo 15, Figura 2.

**Figura 2.** Terminal nervoso pré-sináptico de uma sinapse axodendrítica glutamatérgica e espinha dendrítica pós-sináptica. O terminal nervoso pré-sináptico contém vesículas sinápticas com transportadores de glutamato, mitocôndria com glutaminase, receptores de glutamato metabotrópicos e transportadores para glutamato (EAAT2) e para glutamina. O terminal dendrítico pós-sináptico contém receptores de glutamato ionotrópicos (AMPA e NMDA) e metabotrópico, e transportadores de glutamato (EAAT3 e EAAT4). As voltas da sinapse estão os processos astrocitários com transportadores de glutamato (EAAT1 e EAAT2) e glutamina, receptores de glutamato e até vesículas repletas de glutamato. O glutamato que escapa da sinapse sem ser removido pelos transportadores pode extravasar para sinapses vizinhas. *AMPA-R*, receptores AMPA; *EAAT1-4*, excitatory amino acid transporters 1-4; *Gln*, glutamina; *Glu*, glutamato; *mGlu-R*, receptor de glutamate metabotrópico; *SA* e *SN*, sistemas de transporte A e N respectivamente (para glutamina).

#### **I.2.1.1.1 – Estado redox e o transporte de glutamato**

Todos os transportadores de glutamato são susceptíveis as variações do estado redox de suas proteínas e, por sua vez, passam por alterações funcionais em resposta a oxidação e redução de grupos sulfidrílicos reativos presentes em suas estruturas. Os transportadores astrocitários e o transportador neuronal contem grupamentos tióis reativos cuja oxidação leva a uma redução da captação de glutamato (Trotti et al., 1998, 1997a; Aoyama et al., 2008). As vesículas sinápticas também apresentam seu sistema de captação de glutamato comprometido na presença de agentes oxidantes com evidências de que os grupamentos tióis presentes na H<sup>+</sup>V-ATPase estariam oxidados (Nogueira et al., 2002; Porciúncula et al., 2004). Portanto, a oxidação de tióis (SH-) e a redução de dissulfetos presentes em proteínas parecem contribuir para o comprometimento tanto dos transportadores astrocitários e neuronal como os vesiculares de glutamato (Volterra et al., 1994a, b, c; Trotti et al., 1997b, 1998). Além de oxidantes exógenos, sabe-se que os sítios modulatórios redox baseados em grupos SH existentes nos transportadores de glutamato, também são alvos de oxidantes endógenos tais como espécies reativas de oxigênio ou radicais livres, e constituem-se um importante mecanismo regulatório fisiológico e patofisiológico da captação de glutamato.

Acredita-se que a inibição dos transportadores de glutamato via oxidação de grupos tióis é regulada pelo estado redox dos resíduos de cisteína contidos nas proteínas que fazem parte da estrutura dos transportadores (Trotti et al., 1997a; 1997b). É importante ressaltar que, no mecanismo de toxicidade envolvendo grupos tióis e o sistema glutamatérgico, os transportadores de glutamato não são os únicos alvos moleculares de oxidação, pois os receptores de glutamato também podem ser afetados por alterações no seu estado redox. O receptor [*N*-metil-*D*-aspartato] NMDA possui um mecanismo regulatório redox baseado em grupos sulfidrílica similar aos dos



transportadores (Aizenman et al., 1989) e, alterações no seu estado redox modificam a sua função.

O (PhSe)<sub>2</sub> também pode atuar como um oxidante dependendo da concentração, desta forma exercendo seus efeitos tóxicos por alterar a estrutura e função de determinadas proteínas por oxidação de grupos sulfidril como, por exemplo, os presentes nos transportadores de glutamato (Nogueira et al., 2004).

### **I.2.1.2 - Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP)**

A GFAP é a principal proteína de filamentos intermediários de 8-9 nm em astrócitos maduros no sistema nervoso central, que foi originalmente descoberta em casos de esclerose múltipla, uma doença caracterizada por desmielinização, gliose reativa intensa e formação de cicatrizes compostas de axônios expostos circundados por astrócitos repletos de filamentos gliais (Eng et al., 2000). Como um membro da família das proteínas do citoesqueleto, é um importante modulador da motilidade e forma dos astrócitos, por prover a estabilidade estrutural aos processos astrocíticos.

Os astrócitos tornam-se reativos e respondem de uma maneira específica denominada astrogliose quando o tecido cerebral sofre injúria resultante de trauma, doença, desordem genética ou insulto químico (Eng et al., 2000). A astrogliose é caracterizada pela rápida síntese de GFAP e filamentos intermediários, proliferação e/ou hipertrofia glial. Devido ao aumento de sua expressão durante danos ao sistema nervoso central, a GFAP pode ainda ser um indicador de neurotoxicidade (O'Callaghan et al., 1995). Sua síntese é aumentada quando os astrócitos são ativados em resposta a uma situação de estresse ou aumento anormal da atividade neuronal (Hansen et al., 1990).

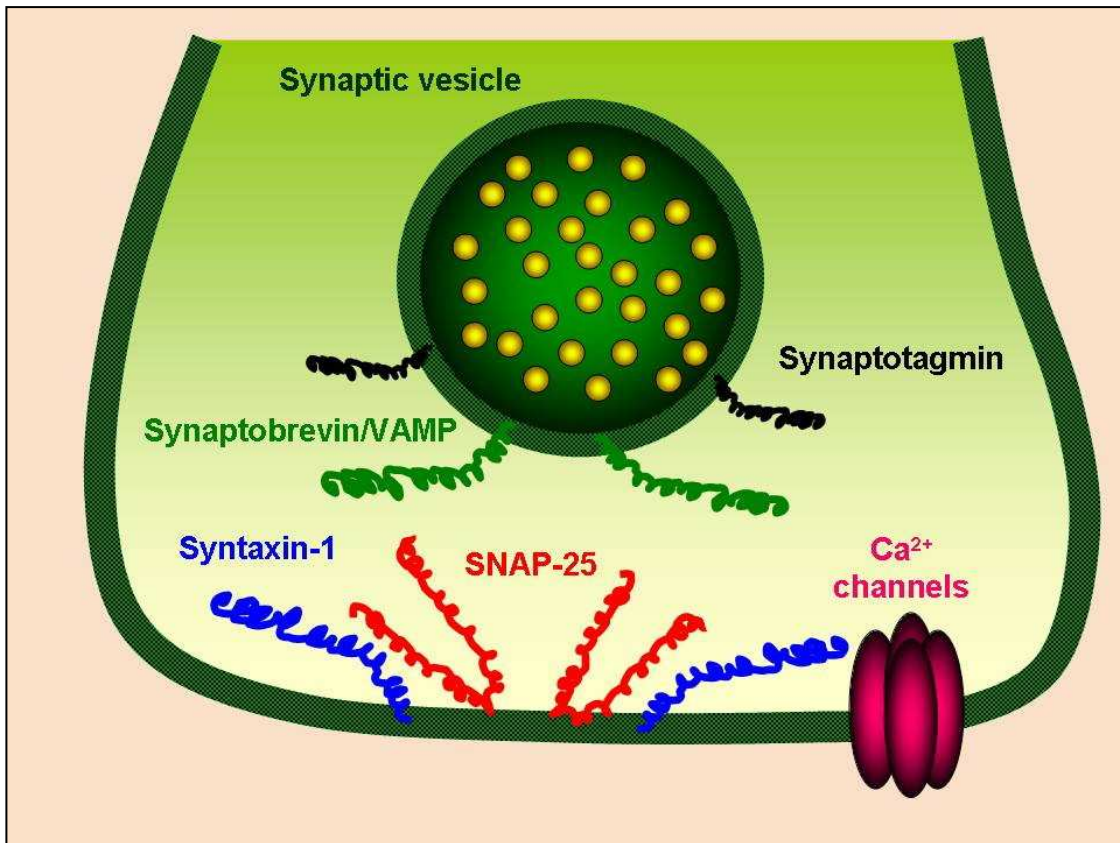
A GFAP também é importante para as interações astrócito-neurônio (McCall et al., 1996; Eliasson et al., 1999), que apresentam um sofisticado sistema de comunicação

recíproca que pode regular a liberação de neurotransmissores, a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Carmignoto, 2000). Em situações de injúria celular como, por exemplo, por tratamento com lipopolissacarídeo (LPS) como um indutor de processos inflamatórios, observa-se um aumento da astrogliose por marcação com GFAP e consequentemente o transporte de glutamato e a expressão de suas proteínas são aumentados (Pekny and Nilsson, 2005; O'Shea et al., 2006).

### **I.2.2.3 – Proteínas Pré-sinápticas**

A formação da sinapse excitatória no sistema nervoso central requer a ação coordenada de um grande número de proteínas complexas e domínios de membranas especializados necessários para a transmissão sináptica. Alguns trabalhos recentes têm identificado alguns eventos celulares na formação da sinapse bem como sinais moleculares que iniciam este processo (Scheiffele 2003; Waites et al. 2005). A transmissão sináptica envolve a fusão de vesículas que contem neurotransmissores com a membrana plasmática e a ativação de receptores pós-sinápticos. O processo de liberação de neurotransmissores por meio da exocitose vesicular é repetido muitas vezes por minuto e esta razão é mantida por todo o tempo de vida da sinapse. Complexos de proteínas, SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), são essenciais na fusão vesicular para a neurotransmissão (Sudhof, 2004). Para a exocitose vesicular sináptica, as SNAREs relevantes são sinaptobrevina/VAMP 1 e 2, syntaxina 1, e *synaptosomal-associated protein-25* (SNAP-25). Sinaptobrevinas/VAMPs estão localizadas primeiramente sobre as membranas das vesículas sinápticas, e syntaxina e SNAP-25, primeiramente sobre a membrana pré-sináptica, nos terminais nervosos (Figura 3). Uma vez que as proteínas pré-sinápticas citadas acima desempenham um importante papel na liberação de neurotransmissores, a

alteração nos níveis de glutamato extracelular poderia modular a atividade de excitose vesicular sináptica via SNAREs.



Fonte: [www.ipsifar.rm.cnr.it/inglese/Luvisetto\\_1UK.html](http://www.ipsifar.rm.cnr.it/inglese/Luvisetto_1UK.html)

**Figura 3.** Localização das proteínas envolvidas na liberação vesicular de neurotransmissores.

### I. 3- Objetivos

Considerando que:

- A regulação e manutenção dos níveis de glutamato extracelulares são de singular importância para o funcionamento celular;
- A função dos transportadores de glutamato gliais, neuronal e vesicular pode ser alterada pelo estado redox dos grupos SH contidos em suas estruturas;
- (PhSe)<sub>2</sub> causa alterações em parâmetros do sistema glutamatérgico;

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da administração aguda do (PhSe)<sub>2</sub> pela via oral sobre a captação de glutamato, *in vivo*. Com o intuito de investigar os mecanismos moleculares pelos quais a captação de glutamato é inibida, o imunoconteúdo dos transportadores glutamatérgicos gliais, neuronal e vesicular foram quantificados. A participação de células da glia foi complementada por análise de western blot e imunistoquímica da proteína glial fibrilar ácida (GFAP), e a neuronal pela detecção do imunoconteúdo da [synaptosomal-associated protein-25] SNAP-25, uma proteína de ancoragem localizada na membrana pré-sináptica neuronal e essencial para a fusão das vesículas sinápticas à membrana do terminal pré-sináptico. A possível influência do estresse oxidativo causado pelo (PhSe)<sub>2</sub> sobre a inibição da captação de glutamato também foi avaliada pela medida das defesas antioxidantes endógenas e parâmetros de dano oxidativo.

# CAPÍTULO II

Artigo em preparação para submissão ao periódico *Toxicology and Applied Pharmacology*

**Inhibition of glutamate uptake into rat hippocampal slices by diphenyl diselenide  
involves modification on vesicular glutamate transporter 1, SNAP-25 and GFAP  
immunoccontent**

<sup>1</sup>Ana Paula Ardais\*, <sup>1</sup>Giordano Gubert Viola, <sup>1</sup>Marcelo Silveira da Costa, <sup>1</sup>Fernanda  
Nunes, <sup>2</sup>Guilherme Antonio Behr, <sup>2</sup>Fábio Klamt, <sup>2</sup>José Claudio Fonseca Moreira,  
<sup>1</sup>Diogo Onofre de Souza, <sup>3</sup>João Batista Teixeira da Rocha, <sup>1</sup>Lisiane de Oliveira

Porciúncula

<sup>1</sup>Laboratory of Studies on the Purinergic System; <sup>2</sup>Center for Oxidative Stress Studies;  
Post-Graduation Program in Biological Sciences-Biochemistry, Department of  
Biochemistry, Health and Basic Sciences Institute; Federal University of Rio Grande do  
Sul, Porto Alegre/RS, Brasil 90035-003. <sup>3</sup> Post-Graduation Program in Toxicological  
Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria/RS, Brasil.

\*Correspondence should be sent to:

Ana Paula Ardais

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil.

Phone: 55-51-3308-5557

FAX: 55-51-3308-5540

E-mail: [ardais@gmail.com](mailto:ardais@gmail.com) (Ardais AP)

## Abstract

Although diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub>, an organo seleno compound, is able to inhibit glutamate uptake into brain slices, there are no studies focus on modifications on glutamate transporters and synaptic-related proteins. In this study, acute administration of (PhSe)<sub>2</sub> was evaluated on glutamate uptake into rat hippocampal slices, as well as on the immunoccontent of glutamate transporters, glial fibrillar acid protein (GFAP), and synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25). The redox state of hippocampal slices from rats treated with (PhSe)<sub>2</sub> was also evaluated. Hippocampal slices from rats treated via oral with a single administration of 1, 10 and 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> showed an inhibition on glutamate uptake (53, 38 and 45 %, respectively). The immunoccontent of GLAST (glial transporter) increased with 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> and EAAC1 (neuronal transporter) in all doses tested. Otherwise, the higher dose of (PhSe)<sub>2</sub> decreased the immunoccontent of vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) and GFAP as well as SNAP-25 at 1 and 100 mg/kg . Immunohistochemical analysis revealed that 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> decreased the number of GFAP-stained astrocytes in the CA1 area, with no evidence of oxidative stress. We supposed that the increase on EAAC1 and GLAST immunoccontent could be a compensatory mechanism conditioned by these transporters in order to reduce the extracellular glutamate levels, avoiding neurotoxic effects caused by (PhSe)<sub>2</sub>. Since there was no signs of oxidative stress, the inhibitory effect of (PhSe)<sub>2</sub> on glutamate uptake seems to be related to a decrease on immunoccontent of VGLUT1, GFAP and SNAP-25. The results suggest that administration of (PhSe)<sub>2</sub> may cause deleterious effects on the hippocampus since decreased the immunoccontent of important proteins involved in the brain homeostasis.

**Key words:** Selenium, glutamate uptake, glutamate transporters, SNAP-25, GFAP, oxidative stress.

## 1. Introduction

Selenium, as a trace element, is essential for normal growth and development of the organism. Selenium and its organic and inorganic analogs usually present antioxidant properties, since selenium is an integral component of the active site of the mammalian enzyme glutathione peroxidase (GSH-Px) (Rotruck et al., 1973). However, inorganic selenium can be highly toxic to several species of mammals and this toxicity could be related to oxidation of endogenous thiol (Painter, 1941; Penrith, 1995).

Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> is an organic-selenium compound that presents antioxidant, anti-inflammatory and anti-nociceptive properties (Rossato et al., 2002; Nogueira et al., 2003). Some assays *in vitro* with this compound revealed its glutathione peroxidase-like activity (Meotti et al., 2004) and others models *in vivo* showed an increase on total selenium content in the brain, indicating that (PhSe)<sub>2</sub> crosses the blood-brain barrier (Maciel et al, 2003; Jacques-Silva et al, 2001). (PhSe)<sub>2</sub> protected hippocampal slices from deleterious effects of oxygen-glucose deprivation and presented anti-depressant and anxiolytic-like effects that involved serotonergic and GABAergic systems (Ghisleni et al., 2003; 2008; Savegnago et al., 2007, 2008).

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in mammals and it is believed to play important roles in several physiological and pathological processes. Glutamate exerts its neurotransmission via two classes of receptors named ionotropic (ligand-gated ion channel) and metabotropic (coupled to G-proteins) (Ozawa et al, 1998; Lipton and Rosenberg, 1994). Extracellular glutamate concentrations are maintained below to toxic levels by high affinity Na<sup>+</sup>-dependent carriers located preferentially at plasma membrane of the astrocytes. There are five excitatory amino acid carriers (EAAC)



present presynaptically and/or postsynaptically in neurons as well as in neighboring glial cells (Masson et al., 1999). In rodents glutamate/aspartate transporter (GLAST, EAAT1 in humans) and glutamate transporter type I (GLT1, EAAT2 in humans) was found primarily only astrocytes membranes (Rothstein, et al., 1994). Two lines of evidence suggest that these two glial transporters are not uniformly distributed on the astrocytic membrane. GLT1 protein co-localizes with the synaptic vesicle protein synaptophysin suggesting its presence in nerve terminals (Minelli et al., 2001). Quantitative electron microscopic analysis shows that GLT1 and GLAST are enriched on astrocytic processes near synaptic termini, suggesting that they are targeted to portions of the membrane that are near to the synapse (Chaudhry et al., 1995). GLT1 is found in high density in the hippocampus and cerebral cortex, while GLAST is more abundant in the Bergmann glia of the cerebellar molecular layer (Chaudhry et al., 1995). Excitatory amino acid transporter 3 (EAAT3, EAAC1 in humans) is preferentially found in neurons albeit it can be detected in astrocytes membranes and seems not be restricted to glutamatergic neurons. The fourth subtype EAAT4 is concentrated in the spines of Purkinje Cells and EAAT5 is a mammalian retina protein (Trotti et al., 1998; for review see Danbolt, 2001).

Glutamate is stored in synaptic vesicles that present a transport system  $\text{Na}^+$ -independent and coupled to  $\text{H}^+$ -ATPase activity. So far, there are three vesicular glutamate transporters (VGLUTs) located in the membranes of synaptic vesicles (Fykse and Fonnum, 1996). VGLUTs are expressed mainly in glutamatergic neurons and distributed in several regions of brain, with VGLUT1 being the more abundant transporter and preferentially located at the hippocampus (Herzog et al., 2001, 2004). The importance of VGLUT1 for normal brain function has been evidenced by studies

where genetic deletion of VGLUT1 has been shown to disrupt synaptic glutamate release and to cause defects in brain development (Wojcik et al., 2004).

Glutamate transporters located at either plasma or vesicular membrane contain reactive thiol groups in their structure and oxidation of these critical cysteinyl residues results in an impairment of glutamate uptake. Consequently, oxidant agents can produce neurotoxicity by increasing extracellular glutamate (Trotti et al., 1997b).

Independent on their pharmacological properties or even toxic effects, organic selenium compounds also affect glutamatergic system. Data from *in vitro* experiments showed that organic selenium analogs that included (PhSe)<sub>2</sub> inhibited glutamate uptake into cortical slices and isolated synaptic vesicles, both inhibitory effects seem to be related to oxidation of thiol groups (Nogueira et al., 2002; Porciúncula et al., 2003; Moretto et al., 2007). In addition, synaptic plasma membranes from rats treated with (PhSe)<sub>2</sub> presented an inhibition of glutamate and MK-801 binding (Nogueira et al., 2001). Even though *in vivo* and *in vitro* experiments have shown that (PhSe)<sub>2</sub> causes alterations on glutamatergic system, there are no studies focus on molecular modifications of glutamate transporters and/or receptors as well as synapse-related proteins caused by this organo seleno compound. Considering i) the importance of the regulation and maintenance of the extracellular glutamate levels by glutamate transporters; ii) the redox-regulation of the glutamate transporters and iii) previous studies in which (PhSe)<sub>2</sub> administration caused alterations on some parameters of glutamatergic neurotransmission, we sought to investigate whether acute administration of (PhSe)<sub>2</sub> could affect glutamate uptake after *in vivo* administration. Besides, we tried to correlate this inhibition with alterations on glutamate transporters, glial fibrillar acid protein (GFAP) and synaptosomal-associated protein-25 (SNAP-25) immunocontent.

Finally, we also evaluated the redox state of hippocampal slices treated with (PhSe)<sub>2</sub> to find some relationship between the glutamate uptake inhibition with oxidative stress.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Chemicals**

(PhSe)<sub>2</sub> was synthesized according to Paulmier, 1986 and dissolved in canola oil. All other chemicals were obtained from Sigma, except when indicated.

### **2.2 Animals and Exposure**

Male albino adult Wistar rats (200 –250 g) from our own breeding colony were used. The animals were kept on separate animal rooms, on a 12 light /dark cycle, at a room temperature of 22°C, with free access to food and water. Rats received (PhSe)<sub>2</sub> (1, 10, or 100 mg/kg) by oral route in a single dose. A group of six rats was usually tested in each experimental group. The control group received only canola oil. Twenty-four hours after (PhSe)<sub>2</sub> administration the animals were euthanized for neurochemical analysis. All procedures were carried out according to NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals and also were approved by the ethical committee of Federal University of Rio Grande do Sul.

### **2.3 Glutamate uptake into rat hippocampal slices**

Glutamate uptake was performed according to Duan et al., 1999, with some modifications. Briefly, after treatment animals were euthanized, hippocampi was dissected out and immediately humidified with PIPES-balanced salt solution (BSS) containing (in mM): NaCl 135, KCl 3.1, CaCl<sub>2</sub> 1.2, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5, PIPES 5, and glucose 2, pH was adjusted to 7.2 with NaOH. Slices from hippocampus (0.4 mm) were obtained using a McIlwain tissue chopper. Slices were pre-incubated at 37°C for 15 min and the medium was replaced by PIPES-BSS. Glutamate uptake was started by

adding 100  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]glutamate. Incubation was stopped after 6 minutes by aspiration of the medium and rinsing slices twice with ice-cold  $\text{Na}^+$ -free BSS. Slices were then lysed in a solution containing 0.1 M NaOH and 0.01% SDS. Unspecific uptake was carried out with  $\text{Na}^+$ -free HBSS (replaced by choline chloride) at 4° C. Specific uptake was considered as the difference between the total uptake and the unspecific uptake. Incorporated radioactivity was measured using a Wallac liquid scintillation counter.

#### **2.4 Western blotting analysis**

Animals were sacrificed twenty-four hours after treatment with  $(\text{PhSe})_2$  or canola oil, hippocampi were dissected out, homogenized in 5% SDS solution containing protease inhibitor cocktail (Sigma, São Paulo/Brazil) and kept at -70° C. Protein content was further determined by using Bicinchoninic acid assay using bovine serum albumin (BSA) as standard (Pierce, São Paulo/Brazil). Hippocampal extracts were diluted to a final protein concentration of 2 mg/ml in SDS-PAGE buffer and 80  $\mu\text{g}$  of the samples (for GLAST, GLT1, EAAC1, VGLUT1, GFAP and SNAP-25), and dual-color prestained molecular weight standards (Bio-Rad, São Paulo, Brazil) were separated by SDS-PAGE (12% with 4% concentrating gel). After electro-transfer, the membranes were incubated overnight with Tris-buffered saline 0.1% Tween-20 (TBS-T) containing 3% BSA. After blocking, the membranes were incubated for 24 h at 4° C with rabbit anti-GLAST antibody (1:1000; Abcam, Cambridge MA, USA), rabbit anti-GLT1 and anti-EAAC1 antibodies (1:1000; Alpha Diagnostics, San Antonio, TX, USA), goat anti-VGLUT1 (1: 10,000), mouse anti-GAPDH (1:3000) and mouse anti-SNAP-25 antibodies (1: 1000) from Chemicon /Millipore, São Paulo/Brazil, and mouse anti-actin (1:2000), rabbit anti-GFAP (1:1000) (Sigma, São Paulo/Brazil). After primary antibodies incubation, membranes were washed and incubated with alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies for 2 h at room temperature and

developed with ECL (Amersham, São Paulo/Brazil). The autoradiographic films were scanned and densitometric analyses were performed using public domain NIH Image Program (developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). As an additional control of the protein loading, membranes were stained with Ponceau S. Results were presented by GLAST, GLT1, EAAC1 or VGLUT1/ GAPDH density unit lines. For GFAP and SNAP-25 results were present by density unit lines using actin as a control of the protein loading.

## **2. 5 Immunohistochemistry**

Perfusion and fixation of the brain was performed through trans-cardiac perfusion with 4% paraformaldehyde. The frozen brain was sectioned (20 µm coronal sections) using a cryostat Leica CM1850 (Leica Microsistemas, São Paulo, Brazil) and sections were mounted on slides coated with 2% gelatin with chromium and potassium sulfate. After drying at room temperature, the mounted sections were stored at -20°C. The detection of astrocytes was carried out using an immunohistochemical detection for GFAP as a marker of astrocytes (Pekny and Nilsson, 2005). The sections were first rinsed for 5 min with phosphate buffered saline (PBS: 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and then three times for 5 min with Trizma base buffer (TBS - 0.05 M containing 150 mM of NaCl, pH 7.2) at room temperature. The sections were blocked with TBS containing 0.2% Triton X-100 and 10% goat serum during 45 min, incubated in the presence of the rabbit anti-GFAP antibody (1:500 dilution in TBS containing 0.2% Triton X-100 and 10% normal goat serum) for 72 hours at 4°C, rinsed three times for 10 min in TBS and subsequently incubated with goat anti-rabbit secondary antibody conjugated with a fluorophore (Alexa Fluor 488, Invitrogen, São Paulo, Brazil) (1:200 dilution in 0.1 M TBS containing 0.2% Triton X-100 and 10% normal serum) for 2 hours at room temperature. After rinsing three times

for 10 min in TBS, the sections were mounting on slides, using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, São Paulo/ Brazil). All sections were examined under a transmission and fluorescence Zeiss Axiovert 200 microscope, with Axiovision software 4.6.

### **2.5.1 Image analysis**

The number of GFAP-stained astrocytes per mm<sup>2</sup> in the CA1, CA3, fimbria and dentate gyrus were estimated (Xavier et al., 2005, Martinez et al., 2006) using Nikon NIS Elements AR 2.30 software. All lighting conditions and magnifications were kept constant. Briefly, a ROI square of 17.918,19 µm<sup>2</sup> was overlaid on the analyzed regions. GFAP-reactive astrocytes located inside this square or intersected by the lower and/or right edges of the square were counted. Astrocytes intersected by the upper and/or left edges of the square were not counted. Nine fields were analyzed for each animal.

## **2.6 Assays for measurement of endogenous antioxidant defenses**

### **2.6.1 Catalase Activity**

Catalase (CAT) activity was assayed by measuring the rate of decrease on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> absorbance at 240 nm (Aebi 1984).

### **2.6.2 Superoxide Dismutase Activity**

Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto oxidation, as previously described (Bannister and Calabrese 1987).

### **2.6.3 Glutathione Peroxidase Activity**

The measure of glutathione peroxidase (GPx) activity was assayed measuring nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase (NADPH) oxidation at 340 nm

in the presence of reduced glutathione, tert-Butyl hydroperoxide, and glutathione reductase (Flohé and Günzler, 1984).

## **2.7 - Assays for measurement of oxidative damage**

### **2.7.1 Lipid peroxidation**

As an index of lipid peroxidation, the formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) during an acid-heating reaction has been used (Draper and Hadley 1990). Briefly, the samples were mixed with 1 ml of TCA 10% and 1 ml of thiobarbituric acid 0.67%, then heated in a boiling water bath for 15 min. TBARS were determined by the absorbance at 535 nm. All the results were normalized by the protein content (Lowry et al. 1951).

### **2.7.2 Protein Damage**

The oxidative damage to proteins was assessed by the determination of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described (Levine et al. 1990). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid (TCA) and redissolved in DNPH and the absorbance read at 370 nm.

### **2.7.3 Determination of non-protein thiols (NPSH)**

NPSH in S1 were determined by the method of (Ellman 1959). Briefly, the S1 was mixed (1:1) with 10% trichloroacetic acid. After the centrifugation, the protein pellet was discarded and free -SH groups were determined in the clear supernatant. An aliquot of clear supernatant was added in potassium phosphate buffer 1 M pH 7.4 and 10 mM 5,5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The color reaction was measured at 412 nm. NPSH levels were expressed as  $\mu\text{mol NPSH/g tissue}$ .

## **2.8. Statistic Analysis**

All data were presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Comparisons between control and (PhSe)<sub>2</sub> groups were performed with one-way ANOVA followed by Newman-Keuls Multiple Comparisons test. Differences between the groups were considered significant for  $P < 0.05$ .

### 3. Results

Hippocampal slices from rats treated with 1, 10 and 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> presented an inhibition of glutamate uptake (53%, 38% and 45%, respectively) when compared to hippocampal slices from canola oil (Fig. 1). Immunoblotting analysis of all glutamate transporters revealed that treatment with 1, 10 and 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> caused distinct modification on immunocontent according to the transporter analyzed. The glial transporter GLT1 immunocontent was not affected by treatment with (PhSe)<sub>2</sub> (Fig. 2a). However, hippocampal slices from rats treated with 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> presented an increase of 32% on GLAST immunocontent when compared to hippocampal slices from canola oil (Fig. 2b). For the neuronal transporter (EAAC1/EAAT3) 1, 10 and 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> caused an increase on the immunocontent (94%, 80% and 79%, respectively) when compared to hippocampal slices from canola oil (Fig. 3a). Analysis of the immunocontent of the VGLUT1 revealed that hippocampal slices treated with 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> presented a decrease of 34 % on VGLUT1 immunocontent (Fig. 3b).

Given that (PhSe)<sub>2</sub> caused modifications on the immunocontent of some glutamate transporters, it was further investigated whether (PhSe)<sub>2</sub> could modify the immunocontent of GFAP as a marker of astrocytes and SNAP-25 as a marker of nerve terminals. (PhSe)<sub>2</sub> caused a decrease of 21 % on GFAP immunocontent only in the highest dose (Fig. 4a), while the immunocontent of SNAP-25 was equally diminished by treatment with 1, 10 and 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> (23, 18.85 and 22.2%, respectively)



(Fig. 4b). Immunohistochemical analysis for GFAP revealed that from all subregions of the hippocampus analyzed (CA1, CA3, fimbria and dentate gyrus (DG), only in the CA1 the treatment with 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> caused a decrease of 25 % on the number of GFAP-stained astrocytes (Figs. 5a and b).

In order to evaluate if oxidative stress triggered by (PhSe)<sub>2</sub> may be involved in the inhibitory effect of glutamate uptake, it was measured the activity of the enzymes responsible for the endogenous antioxidant defenses. The activity of CAT, the antioxidant enzyme that metabolizes hydroperoxides, presented an increase of 34% in the hippocampal extracts from 1 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> (Fig. 6a). Although SOD activity presented a slightly increase by treatment with (PhSe)<sub>2</sub> the results are not statistically significant (Fig. 6b). The glutathione peroxidase activity was also evaluated and (PhSe)<sub>2</sub> treatment did not cause any effect (Fig. 6c).

The oxidative damage of the hippocampal extracts was evaluated by determination of carbonyl groups, lipid peroxidation and non proteic thiols measurements. The results showed that 1 and 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> reduced products of lipid peroxidation (54 and 37.5%, respectively) (Fig. 7a). However, the content of carbonyl groups and the determination of non-protein thiols (NPSH) did not present any differences in hippocampal extracts from canola oil and (PhSe)<sub>2</sub> (Figs. 7b and c).

#### **4. Discussion**

Previous studies have shown that (PhSe)<sub>2</sub> modified some parameters of the glutamatergic neurotransmission such as glutamate and analogs binding as well glutamate uptake into isolated synaptic vesicles and acutely dissociated slices (Nogueira et al., 2002, 2001; Moretto et al., 2007). In our study, hippocampal slices from acute treatment with (PhSe)<sub>2</sub> presented an inhibition on glutamate uptake in all doses tested.

Our results are in agreement with other *in vitro* studies, where this inhibitory effect was observed in cortical slices incubated with (PhSe)<sub>2</sub> (Moretto et al., 2007). The immunocontent of all glutamate transporters was analyzed and distinct effects could be observed by (PhSe)<sub>2</sub> treatment.

Hippocampal extracts from rats treated with (PhSe)<sub>2</sub> presented an increase on the neuronal transporter (EACC1) and the glial transporter (GLAST) immunocontent, findings that did not match with the inhibitory effect on glutamate uptake. Although it is believed that GLT1 is the main transporter responsible for the removal of glutamate from the synaptic cleft avoiding neurotoxicity, we supposed that the increase on neuronal transporter (EACC1) and the glial transporter (GLAST) may be a compensatory mechanism to avoid toxic effects caused by (PhSe)<sub>2</sub>, because these transporters also respond to brain insults (Zagami et al., 2009). Even though GLT1 is the most abundant transporter when compared to GLAST in the hippocampus, (PhSe)<sub>2</sub> did not cause any effect on GLT1 immunocontent, a finding that could discard the participation of this transporter in the inhibitory effects on glutamate uptake. Our results showed a decrease on VGLUT1 immunocontent by the treatment with 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub>. VGLUT1 is highly enriched in the hippocampus being used for identifying glutamatergic neurons and considered the main vesicular transporter. Thus, a decrease on VGLUT1 immunocontent by the highest dose of (PhSe)<sub>2</sub> could explain the reduction on the glutamate uptake. In agreement, the uptake activity into acutely dissociated slices seems to be more related to nerve terminal rather than glial uptake (Furness et al., 2008; for review see Danbolt, 2001). It is important to emphasize that albeit astrocytes also contain synaptic vesicles and express VGLUTs (Bezzi et al., 2004), the role of the uptake and release process in glial cells remains still an unresolved question.

Differently from *in vitro* data where incubation with this organo seleno compound did not cause any effect on GFAP (Moretto et al., 2005), the treatment with (PhSe)<sub>2</sub> caused a decrease on GFAP immunoccontent followed by a reduction on the number of GFAP-stained astrocytes in the highest dose of (PhSe)<sub>2</sub>. These findings showed that an important protein from the cytoskeleton of the astrocytes was decreased by (PhSe)<sub>2</sub> with subsequent changes in the functionality of these cells such as glutamate uptake. In fact, some experimental treatments that result in phenotypic changes resembling glial activation have been shown to decrease GFAP staining with subsequent inhibition of glutamate uptake (Swarowsky et al., 2008). On the other hand, studies have reported an increase on GFAP and glutamate transporters (Pekny and Nilsson, 2005) whereas after brain trauma there was a reduction in the GFAP-stained astrocytes with a consequent decrease on the glutamate transporters expression (van Landeghem et al., 2006). Otherwise, lypopolissacharide-induced inflammation increases GFAP expression with a decrease on GLT1 content (O'Shea et al., 2006). Thus, our findings lead us to consider that astrocytes may be a target of deleterious effects caused by (PhSe)<sub>2</sub>. Based on these statements, our results suggest that a decrease on GFAP immunoreactivity caused by (PhSe)<sub>2</sub> with a reduction on glutamate uptake could be related to its toxic effects.

The analysis of presynaptic marker proteins such as SNAP-25 usually reveals the viability and functionality of nerve terminals since a decrease observed on the immunoccontent of SNAP-25 was frequently accomplished by neuronal death in some models of brain injury (Ishimaru et al., 2001; Suh et al., 2008). Our findings showed that (PhSe)<sub>2</sub> may be toxic to nerve terminals, since the immunoccontent of SNAP-25 was dramatically diminished by treatment with (PhSe)<sub>2</sub>. Besides astrocytes, this organo seleno compound could also be toxic to nerve terminals and subsequently the

glutamatergic neurotransmission may be impaired because there are less vesicular transporters followed by a decrease on an important protein that anchors synaptic vesicles.

It is well known that seleno organic compounds including (PhSe)<sub>2</sub> present dual effects on redox state of cells because according to the dose they can act as antioxidant or oxidant (Rossato et al., 2002; Rosa et al.; 2007). ROS oppose the removal of glutamate from the extracellular space by inhibiting the high affinity glutamate transporters, which supports the concept that ROS formation and the development of excitotoxicity are interdependent (Coyle and Puttfarhen, 1993). Moreover, this event may trigger a vicious amplifying cycle of the neurotoxic cascades, since increased extracellular glutamate would further enhance ROS formation (Pellegrini-Giampietro et al., 1990). In the same context, studies demonstrated that glutamate uptake in astrocytes is reduced by ROS (Volterra et al., 1994) and that inhibition probably derives from direct oxidation of reactive cysteine residues in the transporter protein structure (Trotti et al., 1997a; 1997b). Thus, EAAC1 neuronal transporter, GLT1 and GLAST astroglial transporters exhibit redox-sensitive properties (Trotti et al., 1997b) and are equally inhibited by oxidants via direct action on the transporter proteins (Trotti et al., 1998). Based on these statements, alterations on redox state of the hippocampal extracts submitted to treatment with (PhSe)<sub>2</sub> could explain the inhibition on glutamate uptake. However, the redox state of hippocampal extracts from rats treated with (PhSe)<sub>2</sub> did not show signs of oxidative stress. On the other hand, products of lipid peroxidation were diminished and the activity of catalase was increased in the lowest dose. Superoxide dismutase activity not presented and glutathione peroxidase activity was not altered in hippocampal extracts from rats treated with (PhSe)<sub>2</sub>. These results discard the involvement of oxidative stress in the inhibition of glutamate uptake.

Altogether, our results showed that treatment with 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> decrease the immunocontent of vesicular glutamate transporter and GFAP causing an impairment on the functionality of glutamatergic system which could be associated to injuries in the nerve terminals and astrocytes.

Given that (PhSe)<sub>2</sub> presents pharmacological benefits that included antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties, our results prompt us to carefully analyze the route and doses of administration of (PhSe)<sub>2</sub> to avoid neurotoxic effects. Besides, all behavioural alterations described by this compound may be related to alterations on important proteins that help to maintain the normal functioning of the glutamatergic neurotransmission.

### **Acknowledgments**

This research was supported by CNPq (Proc. N° 472832/2007-7, Lisiane O. Porciúncula), Brazilian Neuroscience Network (IBNnet), National Institutes of Science and Technology (INCT/Brazil). Fernanda Nunes is supported by a CNPq fellowship.

## References

- Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* **105**, 121–126.
- Bannister, J. V., and Calabrese, L. (1987). Assays for SOD. *Methods Biochem Anal* **32**, 279–312.
- Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J. L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., Volterra, A. (2004). Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci.* **7(6)**, 613-620.
- Chaudhry, F. A., Lehre, K. P., van Lookeren Campagne, M., Ottersen, O. P., Danbolt, N. C., and Storm-Mathisen, J. (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* **15**, 711–720.
- Coyle, J. T., and Puttfarcken, P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **26**, 689–695.
- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* **65**, 1–105.
- Duan, S., Anderson, C. M., Stein, B. A., and Swanson, R.A. (1999). Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci.* **19(23)**, 10193-10200.
- Draper, H. H. and Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **186**, 421–431.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem.* **82**, 70–77.
- Flohé, L., and Günzler, W. A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* **105**, 114–121.
- Fykse, E. M., and Fonnum, F. (1996). Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake. *Neurochem Res.* **21**, 1053–1060.

- Furness, D. N., Dehnes, Y., Akhtar, A. Q., Rossi, D. J., Hamann, M., Grutle, N. J., Gundersen, V., Holmseth, S., Lehre, K. P., Ullensvang, K., Wojewodzic, M., Zhou, Y., Attwell, D., Danbolt, N. C. (2008). A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience* **157**(1), 80-94.
- Ghisleni, G., Porciúncula, L. O., Cimarosti, H., Batista, T., Rocha, J., Salbego, C. G., and Souza, D. O. (2003). Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Res.* **986**(1-2), 196-199.
- Ghisleni G, Kazlauckas V, Both F. L, Pagnussat N, Mioranza S, Rocha J. B. T., Souza D. O., and Porciúncula L. O. (2008). Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: putative roles of GABA<sub>A</sub> and 5HT receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **32**(6), 1508-1515.
- Herzog, E., Bellenchi, G. C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2001). The Existence of a Second Vesicular Glutamate Transporter Specifies Subpopulations of Glutamatergic Neurons. *J Neurosci.* **21**, 181.
- Herzog, E., Gilchrist, J., Gras, C., Muzerelle, A., Ravassard, P., Bedet, C., Giros, B., Gaspar, S., and El Mestikawy, S. (2004). Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* **123**, 983-1002.
- Ishimaru, H., Casamenti, F., Ueda, K., Maruyama, Y., and Pepeu, G. (2001). Changes in presynaptic proteins, SNAP-25 and synaptophysin, in the hippocampal CA1 area in ischemic gerbils. *Brain Res.* **903**(1-2), 94-101.

- Jacques-Silva, M. C., Nogueira, C. W., Broch, L. C., and Rocha, J. B. T. (2001). Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in brain of mice. *Pharmacol Toxicol.* **88**, 119-125.
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., and Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**, 464-478.
- Lipton, S. A., and Rosenberg, P. A. (1994). Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl J Med.* **330**, 613-622.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**, 265-275.
- Maciél, E. N., Flores, E. M. M., Rocha, J. B. T., Folmer, V. (2003). Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. *Bull Environm Contam Toxicol.* **70**, 470-476.
- Martinez, F. G., Hermel, E. E., Xavier, L. L., Viola, G. G., Riboldi, J., Rasia-Filho, A. A., Achaval, M. (2006). Gonadal hormone regulation of glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in the medial amygdala subnuclei across the estrous cycle and in castrated and treated female rats. *Brain Res.* **1108**, 117-126.
- Masson, J., Sagné, C., Hamon, M., El Mestikawy, S. 1999. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev.* **51(3)**, 439-64.
- Minelli, A., Barbaresi, P., Reimer, R. J., Edwards, R. H., and Conti, F. (2001). The glial glutamate transporter GLT-1 is localized both in the vicinity of and at distance from axon terminals in the rat cerebral cortex. *Neuroscience* **108**, 51-59.
- Moretto, M. B., Funchal, C., Zeni, G., Rocha, J. B. T., Pessoa-Pureur, R. (2005). Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal



proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. *Toxicology* **210(2-3)**, 213-222.

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

Nogueira, C. W., Rotta, L. N., Perry, M. L., Souza, D. O., and Rocha, J. B. T. (2001). Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system *in vitro* and *in vivo*. *Brain Res*. **906**, 157–163.

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

Nogueira, C. W., Quinhones, E. B., Jung, E. A. C., Zeni, G., and Rocha, J. B. T. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res*. **52**, 56-63.

O'Shea, R. D., Lau, C. L., Farso, M. C., Diwakarla, S., Zagami, C. J., Svendsen, B. B., Feeney, S. J., Callaway, J. K., Jones, N. M., Pow, D. V., Danbolt, N. C., Jarrott, B., and Beart, P. M. (2006). Effects of lipopolysaccharide on glial phenotype and activity of glutamate transporters: Evidence for delayed up-regulation and redistribution of GLT-1. *Neurochem Int*. **48(6-7)**, 604-610.

Ozawa, S., Kamiya, H., and Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*. **54**, 581-618.

Painter, E. P. (1941). The chemistry and toxicity of selenium compounds, with special reference to the selenium problem. *Chem Rev*. 179-213.

- Paulmier, C. (1986). Selenium reagents and intermediates in: *Organic Synthesis*. Oxford, Pergamon.
- Pekny, M., and Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis, *Glia*. **50**, 427–434.
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Cherici, G., Alesiani, M., Carla, V., Moroni, F. (1990). Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci*. **10(3)**, 1035-41.
- Penrith, M. L. (1995). Acute selenium toxicosis as a cause of paralysis in pigs. *J S Afr Vet Assoc*. **66**, 47-48.
- Porciúncula, L. O., Rocha, J. B. T., Cimarosti, H., Vinadé, L., Ghisleni, G., Salbego C. G., Souza, D. O. (2003). Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunoccontent of inducible nitric oxide synthase. *Neurosci Lett*. **346(1-2)**, 101-4
- Rosa, R. M., Roesler, R., Braga, A. L., Saffi, J., Henriques, J. A. (2007). Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. *Braz J Med Biol Res*. **40(10)**, 1287-304.
- Rossato, J. I., Ketzer, L. A., Centurião, F. B., Silva, S. J. N., Lüdtké, D. S., Zeni, G., Braga, A. L., Rubin, M. A., and Rocha, J. B. T. (2002). Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain. *Neurochem Res*. **27**, 297-303.
- Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., and Kuncl. R. W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* **13**, 713–725.

- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., and Hoestra, W. G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* **179**, 558–560.
- Savegnago, L., Jessé, C. R, Pinto, L. G, Rocha, J. B. T., Barancelli, D. A., Nogueira, C. W., Zeni, G. (2008). Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. *Pharmacol Biochem Behav.* **(4)**, 418-26.
- Savegnago, L., Jessé, C. R, Pinto, L. G, Rocha, J. B. T., Nogueira, C. W., Zeni, G. (2007). Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* **31(6)**, 1261-9.
- Swarowsky, A., Rodrigues, L., Biasibetti, R., Leite, M. C., de Oliveira, L. F., de Almeida, L. M., Gottfried, C., Quillfeldt, J. A., Achaval, M., and Gonçalves, C. A. (2008). Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res.* **190(2)**, 206-211.
- Suh E. C., Jung Y. J., Kim Y. A., Park, E. M., and Lee K. E. (2008). A beta 25-35 induces presynaptic changes in organotypic hippocampal slice cultures. *Neurotoxicology* **29(4)**, 691-699.
- Trotti, D., Nussberger, S., Volterra, A., and Hediger, M. A. (1997a). Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human neuronal glutamate transporter EAAC1. *Eur J Neurosci.* **10**, 2207–2212.

- Trotti, D., Rizzini, B. L., Rossi, D., Haugeto, O., Racagni, G., Danbolt, N. C., and Volterra, A. (1997b). Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur J Neurosci.* **9**, 1236–1243.
- Trotti, D., Danbolt, N. C., and Volterra, A. (1998). Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol Sci.* **19**, 328–334.
- Van Landeghem F. K., Weiss T., Oehmichen M., and Von Deimling A. (2006). Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* **23(10)**, 1518- 1528.
- Volterra, A., Trotti, D., Tromba, C., Floridi, S. and Racagni, G. (1994). Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci.* **5**, 2924–2932.
- Wojcik S.M., Rhee J.S., Herzog E., Sigler A., Jahn R., Takamori S., Brose N., and Rosenmund C. (2004). An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**, 7158–7163.
- Xavier, L. L., Viola, G. G., Ferraz, A. C., da Cunha, C., Deonizio, J. M., Netto, C. A., Achaval, M. (2005). A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **16**, 58-64.
- Zagami, C. J., Beart, P. M., Wallis, N., Nagley, P., O'Shea, R. D. (2009). Oxidative and excitotoxic insults exert differential effects on spinal motoneurons and astrocytic glutamate transporters: Implications for the role of astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* **57(2)**, 119-35.

## Legends

**Figure 1.** Acute administration of 1, 10 or 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> on glutamate uptake into rat hippocampal slices, *in vivo*. Adult rats were treated by oral route with a single dose of (PhSe)<sub>2</sub> and the control group received a single of canola oil. Data are expressed as nmol/mg protein/min. Data are reported as mean ± SEM of 4-6 animals per group. \**p*<0.05 as compared to the control group (one-way ANOVA/Newman-Keuls).

**Figure 2.** Representative and quantitative Western blotting analysis of the hippocampal GLT1 and GLAST immunocontent from control and (PhSe)<sub>2</sub>-treated. Adult rats were treated by oral route with a single dose of 1, 10 or 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> and the control group received a single of canola oil. **A)** At the top are representative bands of the quantitative analysis: GLT1 at 69 kDa GLAST at 64 kDa; GAPDH at 37 kDa. **B)** At the top are representative bands of the quantitative analysis: GLAST at 64 kDa; GAPDH at 37 kDa. Graphic represents means ± SEM of the ratio of optical densities from 3-5 (A) and 5-7 (B) hippocampal extracts per group. \**p*<0.05 as compared to the control group (one-way ANOVA/Newman-Keuls).

**Figure 3.** Representative and quantitative Western blotting analysis of EAAC1 and VGLUT1 immunocontent from hippocampal extracts from control and (PhSe)<sub>2</sub>-treated. Adult rats were treated by oral route with a single dose of 1, 10 or 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> and the control group received a single of canola oil. **A)** At the top are representative bands of the quantitative analysis: EAAC1 at 70 kDa; GAPDH at 37 kDa. **B)** At the top are representative bands of the quantitative analysis: VGLUT1 at 61 kDa; GAPDH at 37 kDa. Graphic

represents means  $\pm$  SEM of the ratio of optical densities from 4-7 (A) and 4-6 (B) hippocampal extracts per group.  $*p < 0.05$  as compared to the control group (one-way ANOVA/Newman-Keuls).

**Figure 4.** Representative and quantitative Western blotting analysis of the hippocampal GFAP and SNAP-25 immunocontent from control and (PhSe)<sub>2</sub>-treated. Adult rats were treated by oral route with a single dose of 1, 10 or 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> and the control group received a single administration of canola oil. **A)** At the top are representative bands of the quantitative analysis: GFAP at 50 kDa;  $\beta$ -actina at 42 kDa. **B)** At the top are representative bands of the quantitative analysis: SNAP-25 at 25 kDa;  $\beta$ -actina at 42 kDa. Graphic represents means  $\pm$  SEM of the ratio of optical densities from 4-5 (A) and 5-6 (B) hippocampal extracts per group.  $*p < 0.05$  as compared to the control group (one-way ANOVA/Newman-Keuls).

**Figure 5.** Representative and quantitative immunohistochemistry analysis of GFAP CA1, CA3, fimbria and dentate gyrus from control and (PhSe)<sub>2</sub>-treated. Adult rats were treated by oral route with a single dose of 1 or 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> and the control group received a single administration of canola oil. The number of animal was of 3 per group. **A)** The representatives images of the CA1 area from control, 1 and 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub>. Images represent the GFAP-stained astrocytes. **B)** Graphic represents means  $\pm$  SEM the number of reactivities astrocytes for GFAP. Data are expressed as number of cells /mm<sup>2</sup>.  $*p < 0.05$  as compared to the control group (one-way ANOVA/Newman-Keuls). Scale bar: 46  $\mu$ m = 100 pixels.

**Figure 6.** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> acute administration on endogenous antioxidant defenses in hippocampal extracts of adult rats, *in vivo*. Adult rats were treated by oral route with a single dose of 1 or 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> and the control group received a single administration of canola oil. **A)** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> acute administration on catalase (CAT) activity. Data are expressed as U CAT/mg protein and reported as mean ± SEM of 4 animals per group. **B)** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> acute administration on superoxide dismutase (SOD) activity. Data are expressed as U SOD/mg protein and reported as mean ± SEM of 4 animals per group. **C)** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> acute administration on glutathione peroxidase (Gpx) activity. Data are expressed as U GPx/mg protein and reported as mean ± SEM of 4-5 animals per group. \**p*<0.05 as compared to the control group (one-way ANOVA/Newman-Keuls).

**Figure 7.** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> acute administration on oxidative damage parameters in hippocampal extracts of adult rats, *in vivo*. Adult rats were treated by oral route with a single dose of 1 or 100 mg/kg (PhSe)<sub>2</sub> and the control group received a single administration of canola oil. **A)** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> acute administration on tiobarbituric acid reactive species (TBARS) formation. Data are expressed as nmol MDA (malondialdehyde)/mg protein and reported as mean ± SEM of 3-5 animals per group. **B)** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> acute administration on carbonyl protein levels. Data are expressed as nmol carbonyl groups/mg protein and reported as mean ± SEM of 4-6 animals per group. **C)** Effect of (PhSe)<sub>2</sub> acute administration on non-protein thiol groups content. Data are expressed as nmol SH/mg protein and reported as mean ± SEM of 4-5 animals per group. \**p*<0.05 as compared to the control group (one-way ANOVA/Newman-Keuls).

Figure 1.

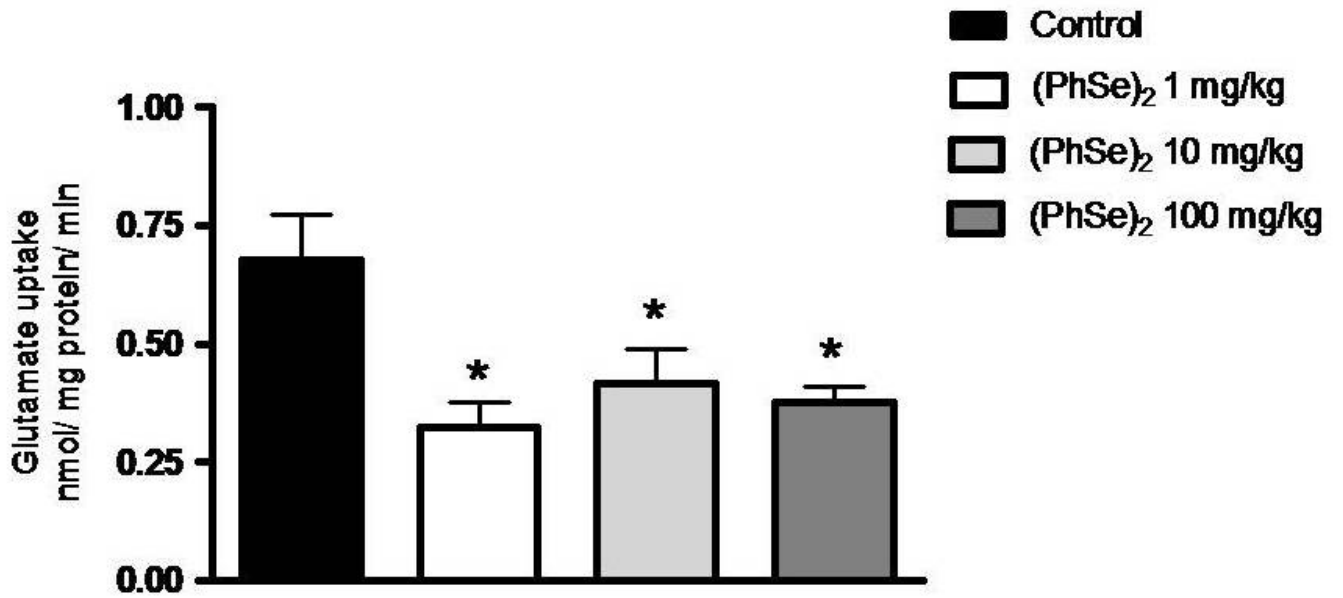




Figure 2.

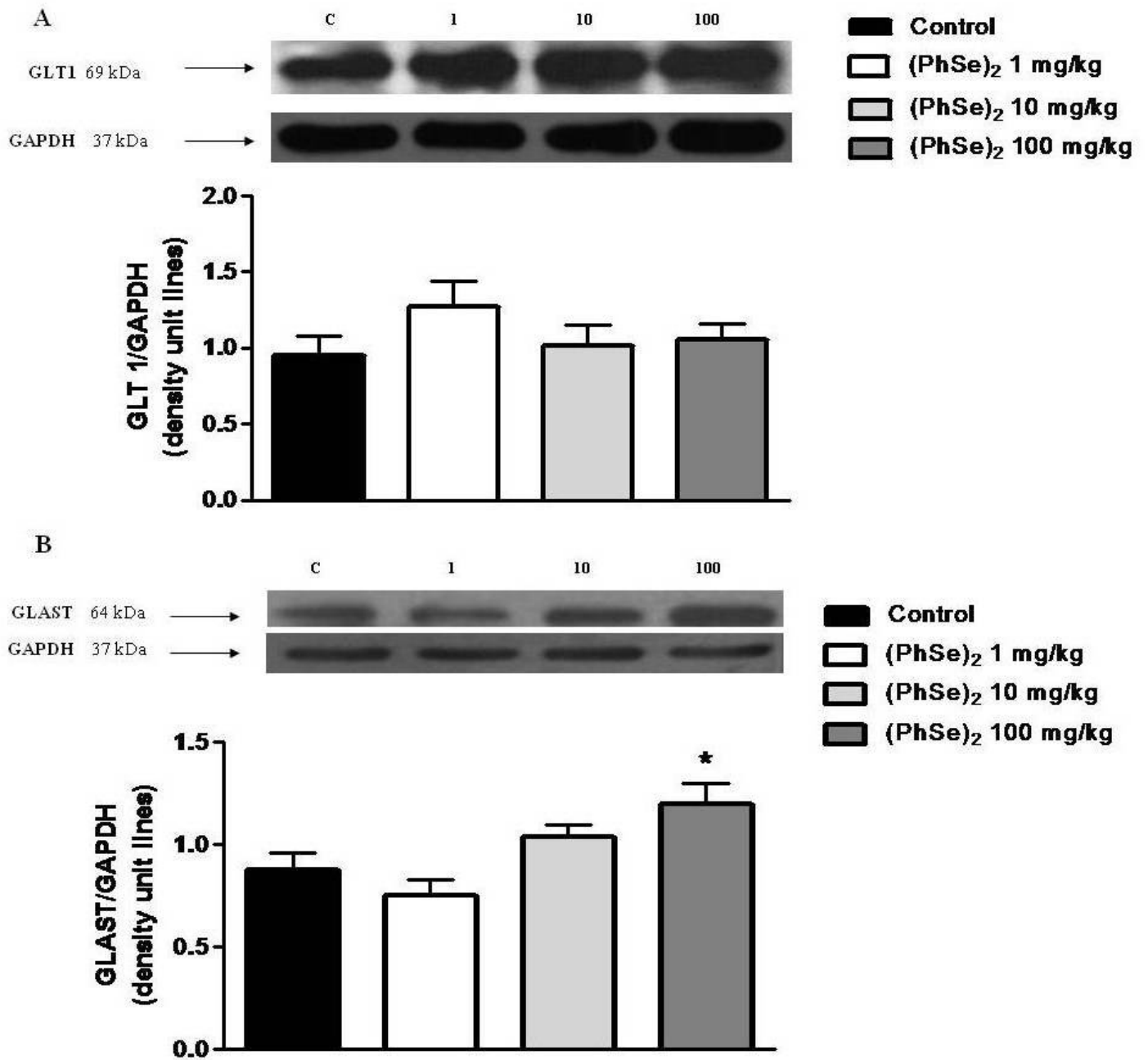


Figure 3.

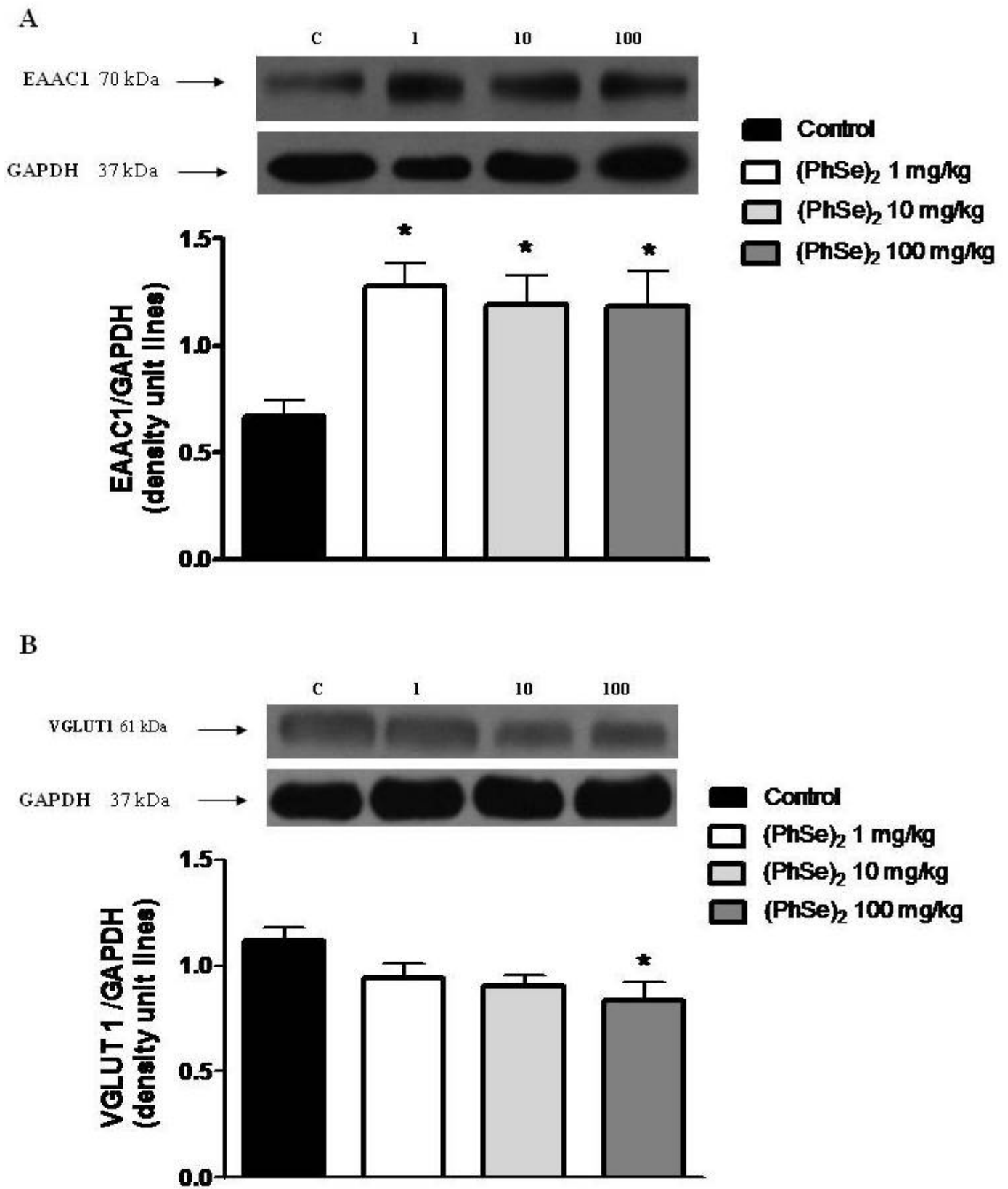


Figure 4.

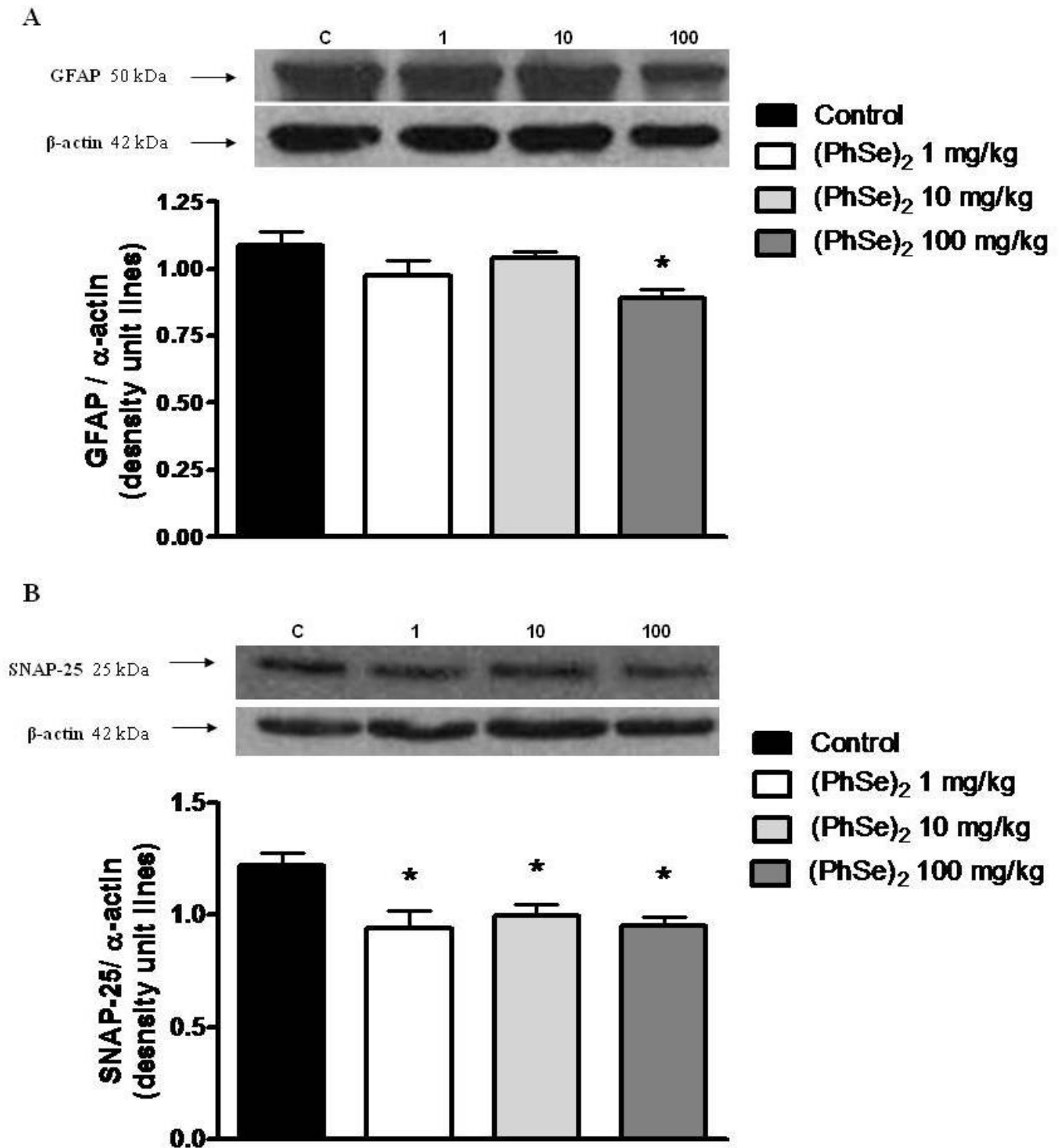


Figure 5.

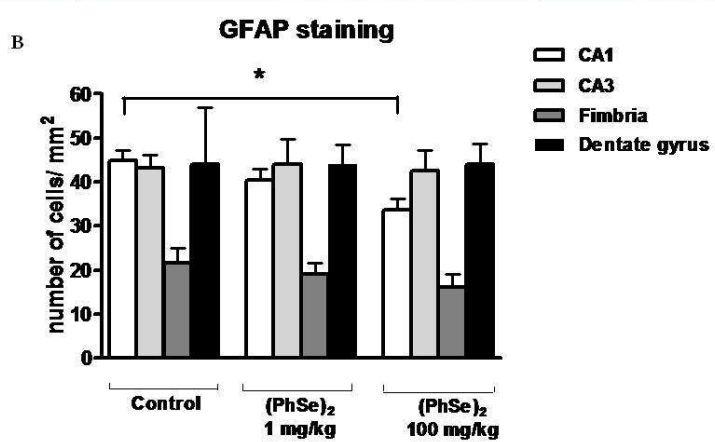
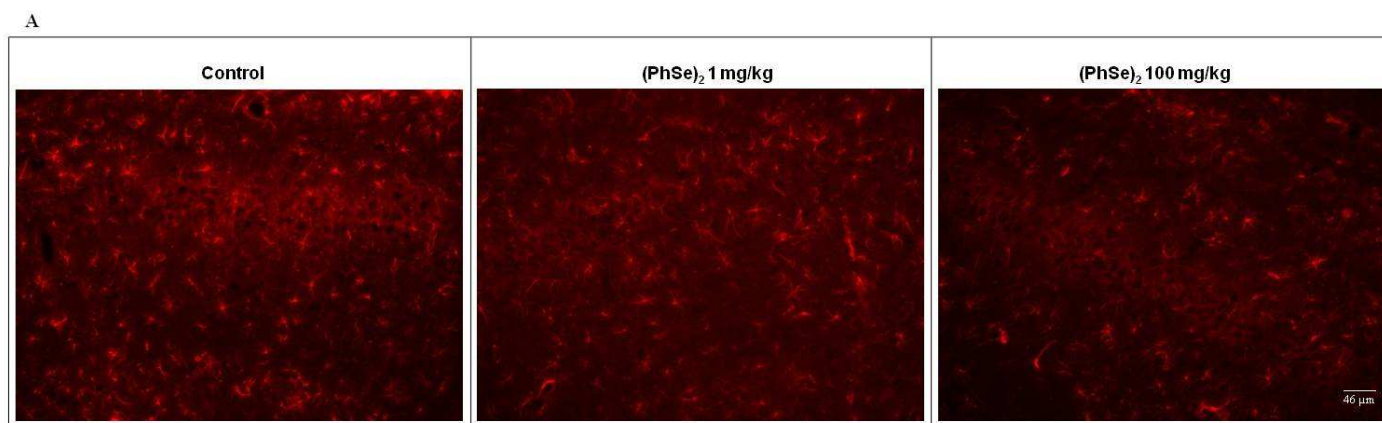


Figure 6.

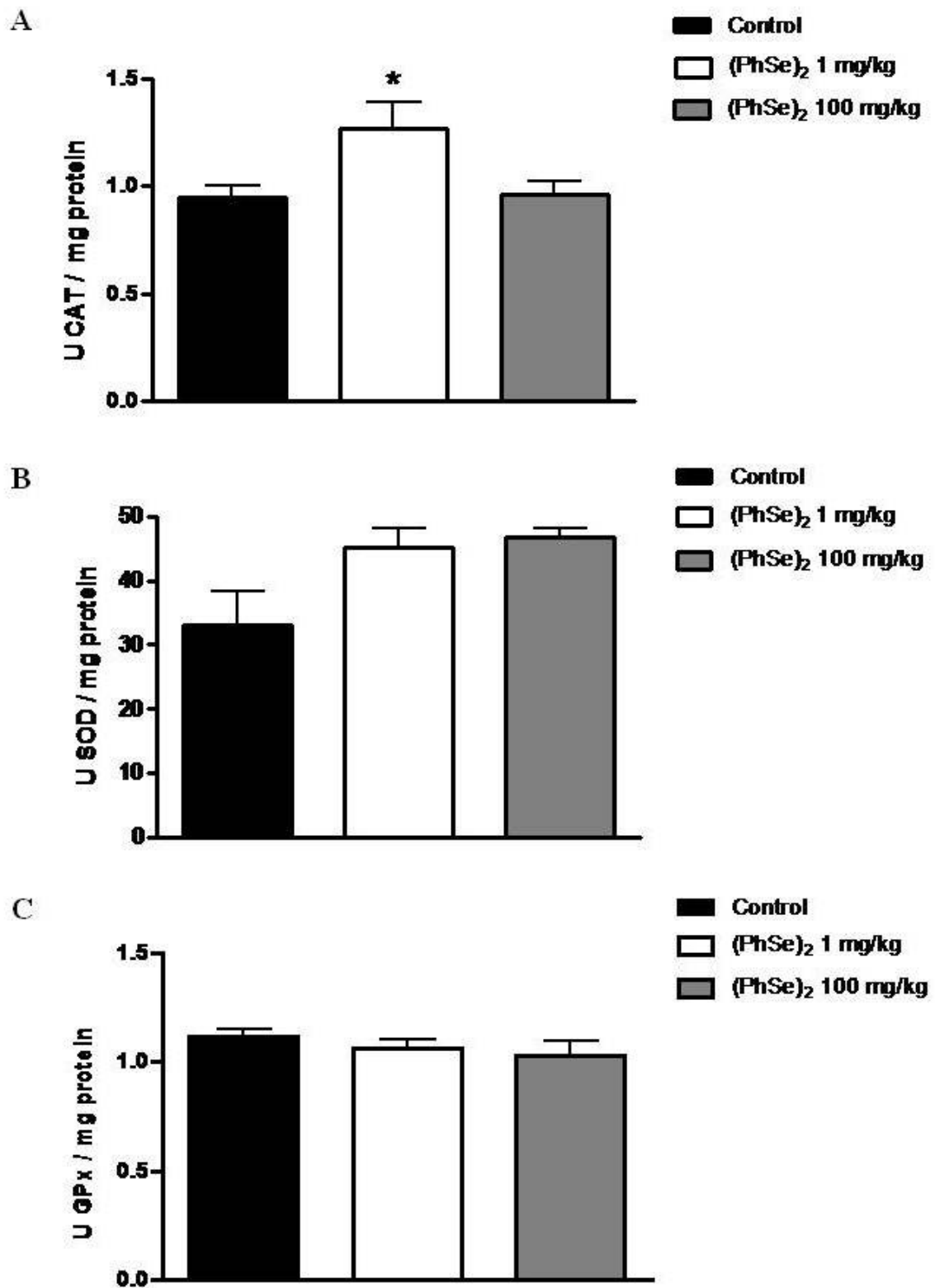
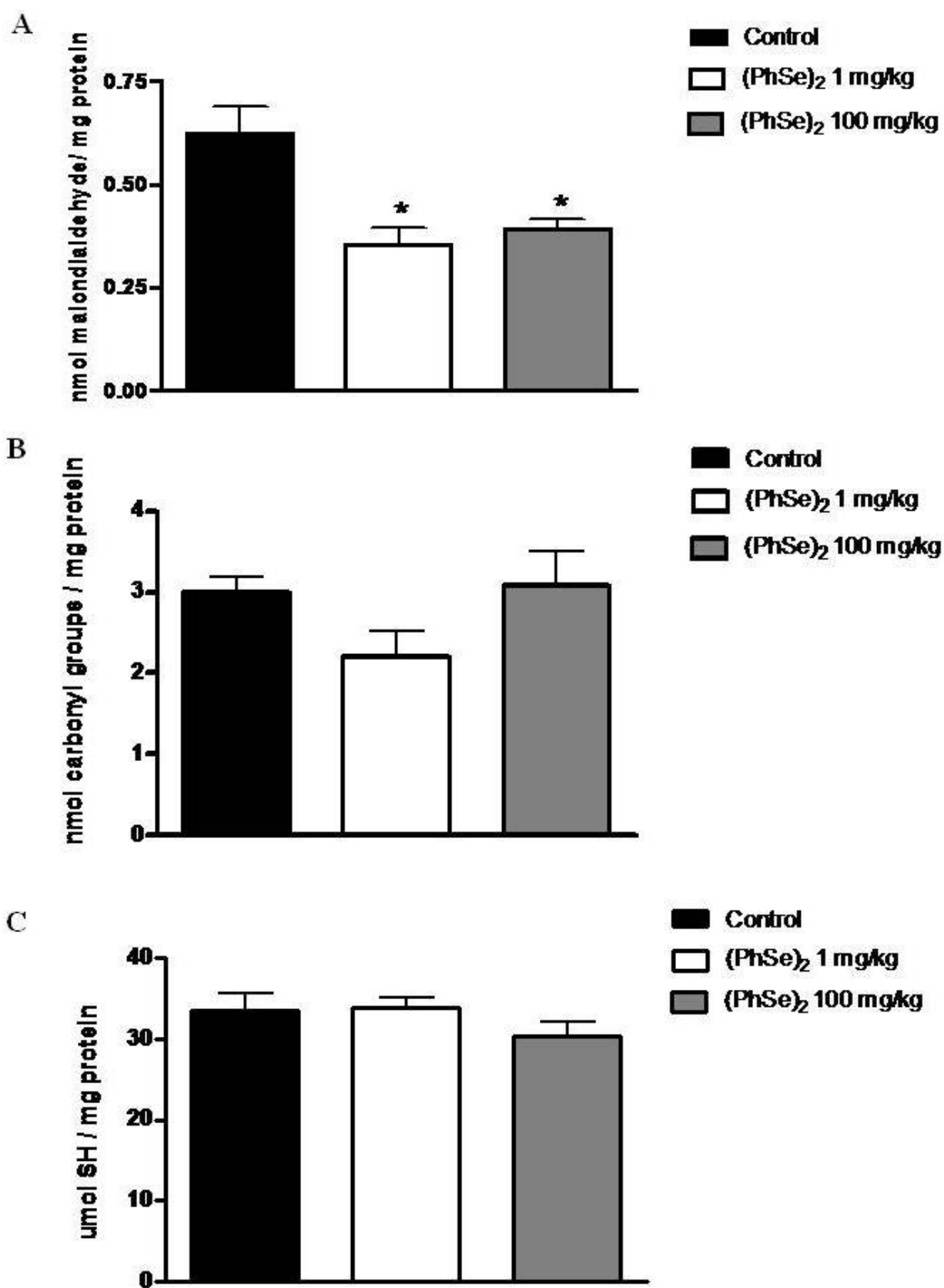


Figure 7.



# **CAPÍTULO III**

## **DISCUSSÃO GERAL**

### III – DISCUSSÃO GERAL

Estudos prévios demonstraram que o (PhSe)<sub>2</sub> foi capaz de modificar alguns parâmetros da neurotransmissão glutamatérgica tais como o *binding* de glutamato e análogos, bem como a captação de glutamato em vesículas sinápticas e em fatias de córtex (Nogueira et al., 2002, 2001; Moretto et al., 2007). Em nosso estudo, o tratamento agudo com (PhSe)<sub>2</sub> inibiu a captação de glutamato em fatias do hipocampo em todas as doses testadas. Nossos resultados estão de acordo com estudos *in vitro* onde este efeito inibitório foi observado em fatias de córtex incubadas com (PhSe)<sub>2</sub> (Moretto et al., 2007). O imunocontéudo de todos os transportadores de glutamato foi analisado e foram encontrados efeitos distintos pelo tratamento com (PhSe)<sub>2</sub>.

O extrato de hipocampo de ratos tratados com (PhSe)<sub>2</sub> apresentou um aumento no imunocontéudo do transportador de glutamato glial (GLAST) e neuronal (EAAC1), entrando em desacordo com o efeito inibitório sobre a captação de glutamato. Embora se acredite que o GLT1 é o principal transportador responsável pela remoção do glutamato da fenda sináptica evitando a neurotoxicidade, nós podemos sugerir que o aumento no imunocontéudo do transportador glial (GLAST) e neuronal (EAAC1) possa ser um mecanismo compensatório para evitar os efeitos tóxicos causados pelo (PhSe)<sub>2</sub> uma vez que esses transportadores também respondem a insultos cerebrais (Zagami et al., 2005, 2009). Mesmo que o GLT1 seja o transportador mais abundante no hipocampo quando comparado ao GLAST, o (PhSe)<sub>2</sub> não foi capaz de alterar o seus imunocontéudo, uma descoberta que poderia descartar a participação deste transportador nos efeitos inibitórios sobre a captação de glutamato. Nossos resultados apontaram um decréscimo sobre o imunocontéudo do transportador vesicular de glutamato VGLUT1, como o causador do efeito inibitório encontrado na captação de glutamato. Além disso, alguns trabalhos confirmam que em fatias de hipocampo a



captação ocorre preferencialmente dentro dos terminais nervosos do que células gliais (Furness et al., 2008; for review see Danbolt, 2001). O hipocampo é altamente enriquecido de VGLUT1 e normalmente anticorpos contra este transportador são utilizados para identificar neurônios glutamatérgicos. O VGLUT1 é considerado ainda, o principal responsável pela liberação de glutamato e um prejuízo funcional neste transportador interrompe a liberação de glutamato no hipocampo (Fremeau et al., 2004; Wojcik et al., 2004).

É importante enfatizar que apesar dos astrócitos também conterem vesículas sinápticas e expressarem VGLUTs (Bezzi et al., 2004), o papel da captação e liberação de glutamato nas células gliais ainda permanece oculto.

Diferentemente de resultados *in vitro*, onde a incubação com (PhSe)<sub>2</sub> não demonstrou qualquer efeito sobre a GFAP (Moretto et al., 2005), a maior dose de (PhSe)<sub>2</sub> utilizada neste trabalho causou uma redução no imunoconteúdo de GFAP e no número de astrócitos marcados por esta proteína. Com esses resultados poderíamos sugerir que (PhSe)<sub>2</sub> estaria causando danos sobre estas células e este evento se refletiria sobre o processo de captação de glutamato. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos experimentais que demonstraram alterações fenotípicas semelhantes ao processo ativação glial seguidos de uma redução na reatividade para GFAP e na expressão dos transportadores de glutamato com subsequente inibição da captação desse neurotransmissor após uma situação de trauma cerebral (Swarowsky et al., 2008; van Landeghem et al., 2006). Entretanto, alguns dados controversos indicam um aumento dos transportadores de glutamato e GFAP (Pekny and Nilsson, 2005), ou ainda, um aumento na expressão de GFAP com uma redução no imunoconteúdo de GLT1 induzida por lipopolissacarídeo (O'Shea et al., 2006). Assim, nossas descobertas nos

levam a considerar que os astrócitos possam ser alvo dos efeitos tóxicos causados pelo (PhSe)<sub>2</sub>.

A viabilidade e funcionalidade dos terminais nervosos podem ser avaliadas pela análise de proteínas marcadoras pré-sinápticas tais como a SNAP-25. Uma redução sobre o imunocontéudo desta proteína é freqüentemente acompanhada de morte neuronal em alguns modelos de injúria cerebral (Ishimaru et al., 2001; Suh et al., 2008). Nossas descobertas mostram que o (PhSe)<sub>2</sub> pode ser tóxico para os terminais nervosos, uma vez que diminui drasticamente o imunocontéudo da SNAP-25 em todas as doses testadas. Dessa forma, a inibição da captação de glutamato encontrada neste trabalho pode estar condicionada ao prejuízo gerado por esse composto nas células astrocitárias e nos terminais nervosos, os quais são responsáveis diretos pela remoção de grande parte do glutamato extracelular via transportadores de glutamato. A redução no imunocontéudo do transportador vesicular também pode estar associada à diminuição do imunocontéudo da SNAP-25 e conseqüente déficit na neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que a SNAP-25 juntamente com a syntaxina ancoram a vesícula na membrana pré-sináptica, para a liberação dos neurotransmissores.

Acredita-se que compostos orgânicos de selênio incluindo o (PhSe)<sub>2</sub> apresentem efeitos contrários sobre o estado redox das células podendo atuar como antioxidante ou oxidante conforme a dose que for utilizada (Rossato et al., 2002; Rosa et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio (ROS) prejudicam a remoção do glutamato do espaço extracelular por reduzir a afinidade dos transportadores pelo glutamato, ratificando o conceito de que a formação de ROS e o desenvolvimento da excitotoxicidade são eventos interdependentes (Coyle & Puttfarcken, 1993). Além disso, este evento pode ativar cascatas neurotóxicas, e dar início a um círculo vicioso onde os níveis extracelulares de glutamato aumentam a formação de ROS e a reação inversa também

torna-se efetiva (Pellegrini-Giampietro et al, 1990). Neste mesmo contexto, alguns trabalhos mostram que a inibição da captação de glutamato em astrócitos gerada por ROS, provavelmente deriva da oxidação direta dos resíduos de cisteína reativos que estão presentes na estrutura das proteínas transportadoras (Volterra et al, 1994b; Trotti et al, 1997a; 1997b). Portanto, os transportadores gliais GLAST e GLT1 e o transportador neuronal EAAC1, exibem propriedades sensíveis ao estado redox (Arriza et al., 1997) e são igualmente inibidos pela ação direta de oxidantes (Trotti et al., 1998). Baseando-se nessas declarações, a análise do estado redox dos extratos de hipocampo dos animais tratados com (PhSe)<sub>2</sub>, poderia ajudar a explicar a inibição da captação de glutamato. Entretanto, o estado redox dos extratos hipocámpais dos animais tratados com este composto orgânico de selênio, não apresentou sinais de estresse oxidativo nos parâmetros analisados. Por outro lado, os resultados mostraram uma redução na formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas duas doses de (PhSe)<sub>2</sub> testadas e um aumento da atividade da catalase (CAT) na dose mais baixa do composto. A superóxido dismutase parece ter tido um ligeiro, mas não significativo aumento na sua atividade e a glutathione peroxidase não apresentou qualquer alteração pelo tratamento com (PhSe)<sub>2</sub>. Esses resultados descartam o envolvimento do estresse oxidativo na inibição da captação de glutamato.

Em geral, nossos resultados mostram que o tratamento com (PhSe)<sub>2</sub> inibe a captação de glutamato e diminui o imunoconteúdo do transportador vesicular de glutamato VGLUT1, GFAP e SNAP-25 prejudicando a funcionalidade do sistema glutamatérgico. Esses efeitos inibitórios podem caracterizar uma situação de injúria nos terminais nervosos e nas células gliais. Assim, tendo em vista que o (PhSe)<sub>2</sub> apresenta benefícios farmacológicos que incluem propriedades neuroprotetoras, antioxidantes e anti-inflamatórias, nossos resultados apontam para a necessidade de uma análise

cuidadosa das doses e vias de administração a serem utilizadas, a fim de evitar os efeitos neurotóxicos deste composto. Além disso, todas as alterações comportamentais descritas por este composto podem ser associadas a alterações em proteínas importantes que ajudam a manter a homeostase da neurotransmissão glutamatérgica.

# **CAPÍTULO IV**

## **CONCLUSÕES**

## IV - CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste trabalho, pode-se concluir que o efeito sobre a funcionalidade da neurotransmissão glutamatérgica causado pelo tratamento com  $(\text{PhSe})_2$  envolve alterações na densidade de proteínas importantes para o funcionamento da sinapse glutamatérgica. A inibição da captação de glutamato pela administração aguda do  $(\text{PhSe})_2$  pela via oral, foi acompanhada de uma redução no imunocontéudo do transportador vesicular de glutamato (VGLUT1) na maior dose testada. Assim, a redução na densidade do VGLUT1 parece ser responsável pelo efeito inibitório causado pelo  $(\text{PhSe})_2$  na captação de glutamato. O  $(\text{PhSe})_2$  diminuiu o imunocontéudo da SNAP-25, uma proteína importante para a manutenção da viabilidade e funcionalidade dos terminais nervosos, uma vez que facilita o processo de ancoramento na membrana pré-sináptica para posterior adesão e fusão das vesículas sinápticas. Este resultado poderia apontar a toxicidade do  $(\text{PhSe})_2$  sobre os terminais nervosos e conseqüente comprometimento da captação de glutamato durante a neurotransmissão sináptica. Um possível efeito tóxico sobre as células gliais também foi observado no tratamento com este composto, pela redução do imunocontéudo da GFAP e do número de astrócitos marcados para esta proteína. Assim, os efeitos tóxicos do  $(\text{PhSe})_2$  poderiam estar agindo tanto sobre os terminais nervosos quanto sobre as células gliais.

A formação de ROS é descrita na literatura como um dos processos envolvidos na inibição da captação de glutamato via oxidação de resíduos de cisteína presentes na estrutura das proteínas transportadoras. Porém, o papel do  $(\text{PhSe})_2$  como um possível oxidante exógeno destes resíduos de cisteína não foi evidenciado neste trabalho. Os parâmetros de estresse oxidativo analisados aqui, não foram alterados e isto nos dá suporte para descartar a influência do estresse oxidativo sobre a inibição da captação de glutamato.

Finalmente, os resultados desse trabalho sugerem que embora  $(\text{PhSe})_2$  apresente uma série de propriedades farmacológicas deve-se sempre considerar a sua dose e forma de administração para que os efeitos benéficos se sobreponham a sua toxicidade. Considerando que o  $(\text{PhSe})_2$  ainda apresenta muitos efeitos desconhecidos sobre o sistema nervoso central, esse trabalho demonstrou que esse composto pode causar alterações em proteínas importantes para o funcionamento e manutenção da homeostase do sistema nervoso central.

# **CAPÍTULO V**

## **PERSPECTIVAS**



## V – PERSPECTIVAS

Considerando as doses e via de administração utilizadas neste trabalho, o  $(\text{PhSe})_2$  apresentou toxicidade aos terminais nervosos e células gliais por alterar a densidade de proteínas importantes para o funcionamento e manutenção da homeostase do sistema nervoso central. Tendo em vista estes resultados, torna-se necessária uma caracterização farmacológica detalhada de doses e vias de administração que permita estabelecer um limite entre a toxicidade e o uso terapêutico deste composto.

Para a melhor compreensão dos mecanismos neurotóxicos e neuroprotetores do  $(\text{PhSe})_2$  sobre o sistema glutamatérgico, propomos a investigação dos seguintes aspectos:

- Estabelecer uma curva de tempo e dose da administração oral do  $(\text{PhSe})_2$ , sobre a densidade dos transportadores de glutamato e proteínas sinápticas como a SNAP-25, syntaxina, sinaptobrevina e PSD-95. Esta análise poderia ajudar a esclarecer o papel controverso do  $(\text{PhSe})_2$  sobre a sinapse glutamatérgica, uma vez que este composto pode atuar como neuroprotetor ou neurotóxico;

- Avaliar as modificações no imunoconteúdo dos receptores de glutamato pelo tratamento com  $(\text{PhSe})_2$  no intuito de estabelecer se essas modificações estão relacionadas aos seus efeitos neurotóxicos ou neuroprotetores, uma vez os receptores de glutamato também são susceptíveis a oxidações.

-

# CAPÍTULO VI

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aizenman, E., Lipton, S. A., Loring, R. H. 1989. **Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation.** *Neuron* 2, 1257–1263.
- Andersson, C. M., Hallberg, A., Linden, M., Brattsand, R., Moldeus, P., Cotgreave, I. 1994. **Antioxidant activity of some diarylselenides in biological systems.** *Free Radic Biol Med.* 16, 17-28.
- Anderson C. M., and Swanson, R. A. 2000 . **Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological functions.** *Glia* 32, 1-14.
- Arriza, J. A., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P., Amara, S. G. 1997. **Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance.** *Proc Nat Acad Sci. USA* 94, 4155–4160.
- Aoyama, K., Suh, S. W., Hamby, A. M., Liu, J., Chan, W. Y., Chen, Y., Swanson, R. A. 2006. **Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse.** *Nat Neurosci.* 9(1), 119-26.
- Aoyama, K., Matsumura, N., Watabe, M., Nakaki, T. 2008. **Oxidative stress on EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction.** *Eur J Neurosci.* 27(1), 20-30.
- Barbosa, N. B., Rocha, J. B., Wondracek, D. C., Perottoni, J., Zeni, G., Nogueira, C. W. 2006. **Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress.** *Chem Biol Interact.* 163, 230-238.
- Beck, M. A., Levander, O. A., Handy, J. 2003. **Selenium deficiency and viral infection.** *J Nutr.* 133, 1463S-1467S.
- Benton, D., 2002. **Selenium intake, mood and other aspects of psychological functioning.** *Nutr Neurosc.* 5, 363-374.
- Benton, D., Cook, R. 1991. **The impact of selenium supplementation on mood.** *Biol.*

*Psychiatry* 29,1092 - 1098.

Bezzi, P., Gundersen, V., Galbete, J. L., Seifert, G., Steinhäuser, C., Pilati, E., Volterra,

**A. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate.** *Nat Neurosci.* 7(6), 613-620.

Borges, V. C., Nogueira, C. W., Zeni, G., Rocha, J. B. T. 2004. **Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets.** *Neurochem Res.* 29, 1505-1509.

Borges, L. P., Borges, V. C., Moro, A. V., Nogueira, C. W., Rocha, J. B. T., Zeni, G. 2005. **Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats.** *Toxicology* 210, 1 - 8.

Borges, L. P., Nogueira, C. W., Panatieri, R. B., Rocha, J. B. T., Zeni, G. 2006. **Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: Effect of diphenyl diselenide on antioxidant defenses.** *Chem Biol Inter.* 160, 99 - 107.

Brito, V. B., Folmer, V., Puntel, G. O., Fachinetto, R., Soares, J. C. M., Zeni, G., Nogueira, C. W., Rocha, J. B. T. 2006. **Diphenyl diselenide and 2,3-dimercaptopropanol increase the PTZ-induced chemical seizure and mortality in mice.** *Brain Res Bull.* 68, 414-418.

Burger, M. E., Fachinetto, R., Calegari, L., Paixão, M. W., Braga, A. L., Rocha, J. B. T. 2004. **Effects of age on reserpine-induced orofacial dyskinesia and possible protection of diphenyl diselenide.** *Brain Res Bull.* 64, 339 - 345.

Burger, M. E., Fachinetto, R., Wagner, C., Perottoni, J., Pereira, R. P., Zeni, G., Rocha, J. B. T. 2006. **Effects of diphenyl-diselenide on orofacial dyskinesia model in rats.** *Brain Res Bull.* 70, 165 - 170.

Cadenas, E., and Sies, H. 1985. **Oxidative stress: excited oxygen species and enzyme activity.** *Adv Enzyme Regulation* 23, 217-37.

- Castellano, C., Cestari, V., Ciamei, A. 2001. **NMDA receptors and learning and memory processes.** *Curr. Drug Targets* 2, 273-283.
- Carmignoto, G. 2000. **Reciprocal communication systems between astrocytes and neurones.** *Prog Neurobiol.* 62(6), 561-581.
- Coco, S., Verderio, C., Trotti, D., Rothstein, J. D., Volterra, A., Matteoli, M. 1997. **Non-synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 in cultured hippocampal neurons.** *Eur J Neurosci.* 9(9), 1902-1910.
- Coyle, J. T., and Puttfarcken, P. 1993. **Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders.** *Science* 26, 689-695.
- Conn, P. J., and Pin, J. P. 1997. **Pharmacology and function of metabotropic glutamate receptors.** *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 37, 205-237.
- Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., Rothstein, J. D., Melone, M. 1997. **EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex.** *Cereb Cortex* 8(2), 108-116.
- Danbolt, N. C. 2001. **Glutamate uptake.** *Prog Neurobiol.* 65, 1-105.
- Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. 1998. **The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia.** *J Neurosci.* 18(10), 3606-3619.
- Dichter, M.A., and Wilcox, K.S. 1997. **Excitatory synaptic transmission. Epilepsy: A comprehensive Textbook.** J. Engel, Jr. and T.A. Pedley. Eds. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R. 2006. **Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review.** *Anal Bioanal Chem.* 385, 1304-1343.

- Eliasson, C., Sahlgren, C., Berthold, C. H., Stakeberg, J., Celis, J. E., Betsholtz, C., Eriksson, J. E., Pekny, M. 1999. **Intermediate filament protein partnership in astrocytes.** *J Biol Chem.* 274(34), 23996-4006.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., Lee, Y. L. 2000. **Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000).** *Neurochem Res.* (9-10), 1439-51.
- Finley, J. W., Penland, J. G. 1998. **Adequacy or deprivation of selenium in healthy men: Clinical and psychological findings.** *J Trace Elem Experim Med.* 11, 11-27.
- Freneau, R. T. Jr., Voglmaier, S., Seal, R. P., Edwards, R. H. 2004. **VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate.** *Trends Neurosci.* 27(2), 98-103.
- Furuta, A., Rothstein, J. D., Martin, L. J. 1997. **Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development.** *J Neurosci.* 17(21), 8363-8375.
- Furness, D. N., Dehnes, Y., Akhtar, A. Q., Rossi, D. J., Hamann, M., Grutle, N. J., Gundersen, V., Holmseth, S., Lehre, K. P., Ullensvang, K., Wojewodzic, M., Zhou, Y., Attwell, D., Danbolt, N. C. 2008. **A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2).** *Neuroscience* 157(1), 80-94.
- Flohé L., Gunzler, W. A., Shock, H. H. 1973. **Glutathione peroxidase: a selenium enzyme.** *FEBS Lett.* 32, 132-134.
- Forder, J. P., Tymianski, M. 2009. **Postsynaptic mechanisms of excitotoxicity: Involvement of postsynaptic density proteins, radicals, and oxidant molecules.** *Neuroscience* 158(1), 293-300.

- Fykse, E. M., Fonnum, F. 1996. **Amino acid neurotransmission: dynamics of vesicular uptake.** *Neurochem Res.* 21(9), 1053- 1060.
- Ge, K., Yang, G. 1993. **The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China.** *Am J Clin Nutr Suppl.* 57, 259S-263S.
- Ghisleni, G., Porciúncula, L. O., Cimarosti, H., Rocha, J.B.T., Salbego, C.G., Souza,D.O. 2003. **Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen–glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent.** *Brain Res.* 986, 196 - 199.
- Hansen, A., Jørgensen, O. S., Bolwig T. G., Barry, D. 1990. **Hippocampal kindling alters the concentration of glial fibrillary acidic protein and other marker proteins in rat brain.** *Brain Res.* 531, 307-311.
- Hisano, S. 2003. **Vesicular glutamate transporter in the brain.** *Anat Sci Int.* 78(4), 191-204.
- Hawkes, W. C., and Hornbostel, L. 1996. **Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit.** *Biol Psychiatry.* 39(2), 121-128.
- Hill, K. E., Zhou, J., McMahan, W. J., Motley, A. K., Burk, R. F. 2004. **Neurological dysfunction occurs in mice with targeted deletion of the selenoprotein P gene.** *J Nutr.* 134, 157-161.
- Holmgren, A. 1985. **Thioredoxin.** *Ann Rev Biochem.* 54, 237-271.
- Ishimaru, H., Casamenti, F., Ueda, K., Maruyama, Y., Pepeu, G. 2001. **Changes in presynaptic proteins, SNAP-25 and synaptophysin, in the hippocampal CA1 area in ischemic gerbils.** *Brain Res.* 903(1-2), 94-101.

- Izquierdo, I., and Medina, J. H. 1997. **Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures.** *Neurobiol Learn Mem.* 68, 285-316.
- Jacques-Silva, M. C., Nogueira, C. W., Broch, L. C., Flores, E. M. M., Rocha, J. B. T. 2001. **Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice.** *Pharm Toxicol.* 88, 119-125.
- Klayman, D. L., and Günther, W. H. 1973. (eds.), **Organic selenium compounds: their chemistry and biology.** *New York: John Wiley and sons*, 68 - 157.
- Kvamme, E. 1998. **Synthesis of glutamate and its regulation.** *Prog Brain Res.* 116, 73-85.
- Levander, O. A., and Burk, R. F. Selenium. 1994. In: Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M. **Modern nutrition in health and disease.** *Philadelphia: Lea and Febiger*, 242-251.
- Lipton, P., and Rosenberg, P. A. 1994. **Excitatory amino acids as final common pathway for neurologic disorders.** *N Engl J Med.* 330, 613-622.
- Maciel, E. N., Flores, E. M. M., Rocha, J. B. T., Folmer, V. 2003. **Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice.** *Bull Environm Contam Toxicol.* 70, 470-476.
- McCall, M. A., Gregg, R. G., Behringer, R. R., Brenner, M., Delaney, C. L., Galbreath, E. J., Zhang, C. L, Pearce, R. A., Chiu, S. Y., Messing, A. 1996. **Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (GFAP) alters neuronal physiology.** *Proc Natl Acad Sci. USA* 93(13), 6361-6.
- Meldrum, B. S., Akbar, M. T., Chapman, A. G. 1999. **Glutamate receptors and transporters in genetic an acquired modles of epilepsy.** *Epilepsy Res.* 36, 189 - 204.



- Meotti, F. C., Stangherlin, E. C., Zeni, G., Nogueira, C. W., Rocha, J. B. T. 2004. **Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation.** *Environ Res.* 94, 276-282.
- Moretto, M. B., Thomazi, A. P., Godinho, G., Roessler, T. M., Nogueira, C. W., Souza, D. O., Wofchuk, S., Rocha, J. B. 2007. **Ebselen and diorganylchalcogenides decrease in vitro glutamate uptake by rat brain slices: prevention by DTT and GSH.** *Toxicol In Vitro*, 21(4), 639-45.
- Moretto, M. B., Funchal, C., Zeni, G., Rocha, J. B., Pessoa-Pureur, R. 2005. **Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats.** *Toxicology* 210 (2-3), 213-222.
- Navsariwala, V. D., Prins, G. S., Swanson, S. M., Birch, L. A., Ray, V. H., Hedayat, S., Lantvit, D. L., Diamond, A. M. 2006. **Selenoprotein deficiency accelerates prostate carcinogenesis in a transgenic model.** *PNAS* 103, 8179-8184.
- Nogueira, C. W., Rotta, L. N., Perry, M. L., Souza, D. O., Rocha, J. B. T. 2001. **Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo.** *Brain Res.* 906, 157-163.
- Nogueira, C. W., Rotta, L. N., Zeni, G., Souza, D. O., Rocha, J. B. T. 2002. **Exposure to ebselen changes glutamate uptake and release by rat brain synaptosomes.** *Neurochem Res.* 27, 283- 288.
- Nogueira, C. W., Meotti, F. C., Curte, E., Pilissão, C., Zeni, G., Rocha, J. B. T. 2003. **Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats.** *Toxicology* 183, 29-37.

- Nogueira, C. W, Zeni, G., Rocha, J. B. T. 2004. **Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology.** *Chem Rev.* 104(12), 6255-85.
- O'Callaghan, J. P., Jensen, K. F., Miller, D. B. 1995. **Quantitative aspects of drug and toxicant-induced astrogliosis.** *Neurochem Int.* (2), 115-24.
- Olney, J. W. 1978. **Neurotoxicity of excitatory amino acid.** Em: *Kainic acid as a tool in neurobiology*, eds: McGeer, E. G.; Olney, J. W.; McGeer, P. L. Raven Press, New York, 95-121.
- O'Shea, R. D., Lau, C. L., Farso, M. C., Diwakarla, S., Zagami, C. J., Svendsen, B. B., Feeney, S. J., Callaway, J. K., Jones, N. M., Pow, D. V., Danbolt, N. C., Jarrott, B., Beart, P. M. 2006. **Effects of lipopolysaccharide on glial phenotype and activity of glutamate transporters: Evidence for delayed up-regulation and redistribution of GLT-1.** *Neurochem Int.* 48(6-7), 604-610.
- Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K. 1998. **Glutamate receptors in the mammalian central nervous system.** *Prog Neurobiol.* 54, 581 -18.
- Parnham, M. J., and Graf, E. 1991. **Pharmacology of synthetic organic selenium compounds.** *Prog Drug Res.* 36, 10-47.
- Pekny, M., and Nilsson, M. 2005. **Astrocyte activation and reactive gliosis.** *Glia.* 50(4), 427-34.
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Cherici, G., Alesiani, M., Carla, V., Moroni, F. 1990. **Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage.** *J Neurosci.* 10(3), 1035-41.
- Porciúncula, L. O., Rocha, J. B. T., Boeck, C. R., Vendite, D., Souza, D. O. 2001. **Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons.** *Neurosc Lett.* 299, 217-220.

Porciúncula, L. O., Rocha, J. B. T., Ghisleni, G., Tavares, R. G., Souza, D. O. 2004.

**The effects of ebselen on [<sup>3</sup>H]glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain.** *Brain Res.* 1027, 192-195.

Posser, T., Moretto, M. B., Dafre, A. L., Farina, M., Rocha, J. B., Nogueira, C. W., Zeni, G., Ferreira, J. D., Leal, R. B., Franco, J. L. 2006. **Antioxidant effect of diphenyl diselenide against sodium nitroprusside (SNP) induced lipid peroxidation in human platelets and erythrocyte membranes: An in vitro evaluation.** *Chem Biol Inter.* 164(1-2), 126-35.

Price, D. L. 1999. **New order from neurological disorders.** *Nature* 339, A3-A5

Rayman, M. 2000. **The importance of selenium to human health.** *The Lancet* 356, 233-241.

Reilly, C. 1996. **Too much of a good thing? The problem of trace element fortification of foods.** *Trends Food Sci Technol.* 7, 139-142.

Robinson, M. D., and Dowd, L. A. 1997. **Heterogeneity and functional subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system.** *Adv Pharmacol.* 37, 69-115.

Rosa, R. M., Roesler, R., Braga, A. L., Saffi, J., Henriques, J. A. 2007. **Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models.** *Braz J Med Biol Res.* 40(10), 1287-304.

Rossato, J. I., Ketzer, L. A., Centurião, F. B., Silva, S. J. N., Lüdtkke, D. S., Zeni, G., Braga, A. L., Rubin, M. A., Rocha, J. B. T. 2002. **Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain.** *Neurochem Res.* 27, 297-303.

- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G., and Hoestra, W. G. 1973. **Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase.** *Science* 179, 558–560.
- Roussyn I, Briviba K, Masumoto H, Sies H. 1996. **Selenium-containing compounds protect DNA from single-strand breaks caused by peroxynitrite.** *Arch Biochem Biophys.* 330(1), 216-8.
- Santos, F. W., Oro, T., Zeni, G., Rocha, J. B. T., Nascimento, P. C., Nogueira, C. W. 2004. **Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice.** *Toxicol Lett.* 152, 255-263.
- Santos, A. R. S., Gadotti, V. M., Oliveira, G. L., Tibola, D., Paszcuk, A. F., Neto, A., Spindola, A. M., Souza, M. M., Rodrigues, A. L. S., Calixto, J. B. 2005. **Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice.** *Neuropharmacology* 48, 1021– 1034.
- Savaskan, N. E., Bräuer, A. U., Kühbacher, M., Eyüpoglu, I. Y., Kyriakopoulos, A., Ninnemann, O., Behne, D., Nitsch, R. 2003. **Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity.** *FASEB J.* 17,112-114.
- Savegnago, L., Trevisan, M., Alves, D., Rocha, J. B. T., Nogueira, C. W., Zeni, G. 2006. **Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide.** *Environ Toxicol Pharmacol.* 21, 86–92.
- Scheiffele, P. 2003. **Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS.** *Annu Rev Neurosci.* 26, 485-508.
- Singh, P., Mann, K. A., Mangat, H. K., Kaur, G. 2003. **Prolonged glutamate excitotoxicity: effects on mitochondrial antioxidants and antioxidant enzymes.** *Mol Cell Biochem.* 243, 139 -145.

- Schousboe A. 1981. **Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons are glial cells.** *Int Rev Neurobiol.* 22, 1-45.
- Schwartz, K., and Foltz, C. M. 1957. **Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration.** *J Am Chem Soc.* 79, 200–214.
- Stadtman, T. C. 1980. **Selenium-dependent enzymes.** *Annu Rev Biochem.* 49, 93 -110.
- Suh, E. C., Jung, Y. J., Kim, Y. A., Park, E. M., Lee, K. E. 2008. **A beta 25-35 induces presynaptic changes in organotypic hippocampal slice cultures.** *Neurotoxicology* 29(4), 691-699.
- Spallholz, J. E., Boylan, L. M., Larsen, H. S. 1990. **Advances in understanding selenium's role in the immune system.** *Ann N Y Acad Sci.* 587, 123-139.
- Spallholz, J. E. 1993. **On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity.** *Free Rad Biol Med.* 17, 45-64.
- Sudhof, T. C. 2004. **The synaptic vesicle cycle.** *Annu Rev Neurosci.* 27, 509-47.
- Swarowsky, A., Rodrigues, L., Biasibetti, R., Leite, M. C., de Oliveira, L. F., de Almeida, L. M., Gottfried, C., Quillfeldt, J. A., Achaval, M., Gonçalves, C. A. 2008. **Glial alterations in the hippocampus of rats submitted to ibotenic-induced lesion of the nucleus basalis magnocellularis.** *Behav Brain Res.* 190(2), 206-11.
- Switala, J., and Loewen, P. C. 2002. **Diversity of properties among catalases.** *Arch Biochem Biophys.* 401, 145–154.
- Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brügger, B., Ringler, P., Müller, S. A., Rammner, B., Gräter, F., Hub, J. S., De Groot, B. L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmüller, H., Heuser, J., Wieland, F., Jahn, R. 2006. **Molecular anatomy of a trafficking organelle.** *Cell* 127(4), 831-46.

- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K. 1997. **Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1.** *Science* 276(5319), 1699-702.
- Torp, R., Hoover, F., Danbolt, N. C., Storm-Mathisen, J., Ottersen, O. P. 1997. **Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and EAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: an in situ hybridization analysis.** *Anat Embryol (Berl)*. 195(4), 317-26.
- Trotti, D., Nussberger, S., Volterra, A., Hediger, M. A. 1997a. **Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human neuronal glutamate transporter EAAC1.** *Eur J Neurosci*. 9, 2207–2212.
- Trotti, D., Rizzini, B. L., Rossi, D., Haugeto, O., Racagni, G., Danbolt, N. C., Volterra, A. 1997b. **Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism.** *Eur J Neurosci*. 9, 1236–1243.
- Trotti, D., Danbolt, N. C., Volterra, A. 1998. **Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration?** *Trends Pharmacol Sci*. 19, 328–334.
- Ursini, F., Heim, S., Kiess, M., Maiorino, M., Roveri, A., Wissing, J., Flohè, L. 1990. **Dual function of the seleno-protein PHGPx during sperm maturation.** *Science* 285, 1393-1396.
- Ursini, F., and Bindoli, A. 1987. **The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes.** *Chem Phys Lip*. 44, 255-276.

- Van Landeghem, F. K., Weiss, T., Oehmichen, M., Von Deimling A. 2006. **Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury.** *J Neurotrauma*. 23(10), 1518-1528.
- Volterra, A., Trotti, D., Floridi, S., Racagni, G. 1994a. **Reactive oxygen species inhibit high-affinity glutamate uptake: molecular mechanism and neuropathological implications.** *Ann N Y Acad Sci*. 738, 153–162.
- Volterra, A., Trotti, D., Racagni, G. 1994b. **Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms.** *Mol Pharmacol* 46,986–992.
- Volterra, A., Trotti, D., Tromba, C., Floridi, S., Racagni, G. 1994c. **Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes.** *J Neurosci*. 14, 2924–2932.
- Waites, C. L., Craig, A. M., Garner, C. C. 2005. **Mechanisms of vertebrate synaptogenesis.** *Annu Rev Neurosci*. 28, 251-74
- Walter, R., Schwartz, I. L., Roy, J. 1972. **Can selenoamino acids act reversible biological antioxidants?** *Ann N Y Acad Sci*. 192, 175-180.
- Wilson, S. R., Zucker, P. A., Huang, R. R. C., Spector, A. 1989. **Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity.** *J Am Chem Soc*. 111, 5936-5939.
- Wojcik, S. M., Rhee, J. S., Herzog, E., Sigler, A., Jahn, R., Takamori, S., Brose, N., Rosenmund C. 2004. **An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size.** *Proc Natl Acad Sci USA*. 101, 7158–7163.
- Zagami, C. J., O'Shea, R. D., Lau, C. L., Cheema, S. S., Beart, P. M. 2005. **Regulation of glutamate transporters in astrocytes: evidence for a relationship between**

**transporter expression and astrocytic phenotype.** *Neurotox Res.* 7(1-2), 143-149.

Zagami, C. J., Beart, P. M., Wallis, N., Nagley, P., O'Shea, R. D. 2009. **Oxidative and excitotoxic insults exert differential effects on spinal motoneurons and astrocytic glutamate transporters: Implications for the role of astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis.** *Glia* 57(2), 119-35.