



UFSM

Tese de Doutorado

**EFEITO NEUROPROTETOR DO DISSELENETO DE
DIFENILA SOBRE A MEMÓRIA, ATIVIDADE
LOCOMOTORA E CAPTAÇÃO DE CÁLCIO FRENTE A
TRAUMA MECANO-ENCEFÁLICO EM RATOS**

Luís Flávio Souza de Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**EFEITO NEUROPROTETOR DO DISSELENETO DE
DIFENILA SOBRE A MEMÓRIA, ATIVIDADE
LOCOMOTORA E CAPTAÇÃO DE CÁLCIO FRENTE A
TRAUMA MECANO-ENCEFÁLICO EM RATOS**

por

Luís Flávio Souza de Oliveira

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

Santa Maria, RS, Brasil

2008

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de
Doutorado

**EFEITO NEUROPROTETOR DO DISSELENETO DE DIFENILA
SOBRE A MEMÓRIA, ATIVIDADE LOCOMOTORA E CAPTAÇÃO
DE CÁLCIO FRENTE A TRAUMA MECANO-ENCEFÁLICO EM
RATOS**

Elaborada por **Luís Flávio Souza de Oliveira** como requisito
parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica
Toxicológica**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dra. Cristina Wayne Nogueira (Orientadora)

Prof. Dr. Félix Antunes Soares

Prof^a. Dra. Maria Rosa Chitolina Schetinger

Prof^a. Dra. Marilise Escobar Bürguer

Prof^a. Dra. Nilda Berenice de Vargas Barbosa

Santa Maria, dezembro de 2008.

AGRADECIMENTOS

A Deus, princípio e fonte de todo bem e de toda graça.

À Tania, pela compreensão, paciência e carinho evidenciados pelo olhar, pelos atos e pelas palavras.

À minha família, pelo exemplo de vida, de determinação e amor inesgotáveis sempre presentes, mesmo à distância.

Aos meus filhos Mikhael e Nicole, combustíveis nos momentos de exaustão; refrigério nas asperezas da vida.

À minha orientadora, Prof^a Cristina Wayne Nogueira, pelo seu profissionalismo competente e humanizado, em prontidão solícita para acolher meus questionamentos e ansiedades.

Ao estimado Prof. João Batista Teixeira da Rocha, pelos ensinamentos, principalmente aqueles inauditos; pelo acolhimento que recebi desde o primeiro contato, pela confiança depositada. O senhor não faz idéia de quanto cresci ao lhe observar.

Aos amigos Andressa Fabro de Bem, Juliano Perottoni e Robson Luiz Puntel. Muito mais que convivência, tivemos partilhadas nossas vidas. Vocês ajudaram a escrever importantes páginas da minha.

A todos os amigos que, alheios ao PPGBTOX, estiveram comigo de alguma forma.

Ao Prof. Gilson Zeni, pelo composto sintetizado, pelo socorro prestado, juntamente com a Prof^a Cristina, quando a saúde me faltou – jamais esquecerei.

À Prof^a Marilise Escobar Bürguer, pelo uso das dependências que acomodam o Water-maze.

A todos os colegas de laboratório que de uma forma ou de outra me ajudaram e me incentivaram durante esta caminhada.

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

Aos funcionários do PPGBTOX, de forma especial à Angélica, pela disposição e preocupação oferecidas a nosso favor.

RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

EFEITO NEUROPROTETOR DO DISSELENETO DE DIFENILA SOBRE A VIABILIDADE MEMBRANAR, MEMÓRIA E ATIVIDADE LOCOMOTORA APÓS INDUÇÃO DE TRAUMA MECANO-ENCEFÁLICO EM RATOS

AUTOR: Luís Flávio Souza de Oliveira

ORIENTADORA: Dra. Cristina Wayne Nogueira

CO-ORIENTADOR: Dr. João Batista Teixeira da Rocha

DATA E LOCAL DA DEFESA: Santa Maria, 2008

As concussões e traumas encefálicos (TBI) são distúrbios imputados às funções cerebrais freqüentemente provocados por forças de aceleração e desaceleração na caixa craniana com ou sem fraturas. Um extenso número de estudos tem demonstrado que o TBI está associado a vários eventos primários, tais como liberação de glutamato, elevação intracelular das concentrações de cálcio, geração de radicais livres, diminuição da concentração sérica de magnésio, alterações comportamentais relacionadas com a perda de memória e prejuízo na atividade locomotora, dentre outras. Tais eventos podem causar danos secundários pela ativação de processos bioquímicos endógenos autodestrutivos. O disseleneto de difenila (PhSe_2) é um composto orgânico à base de selênio que tem demonstrado vários efeitos biológicos, os quais podem ser adicional e potencialmente efetivos à terapia do TBI. A cooperação deste estudo mostra-se interessante pela avaliação da administração oral de (PhSe_2) frente a um modelo de trauma induzido em ratos usando como parâmetros avaliativos a recaptação de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ membranar em fatias de córtex, estriado e hipocampo; a dosagem sérica dos níveis de magnésio; a aquisição e facilitação de memória através dos testes do medo condicionado, alternância espontânea e estímulo auditório; a atividade locomotora através dos testes de campo aberto e rota-rod. Neste estudo foi possível verificar o aumento da captação de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ membranar nas fatias de córtex, estriado e hipocampo em todos os animais que foram submetidos ao trauma e ao tratamento oral de (PhSe_2) (100 mM, 15 minutos após o TBI), especialmente aos que receberam pré-tratamento e tratamento (20 mM por 3 dias que antecederam o trauma e 100 mM, 15 minutos após o TBI), quando comparados aos animais que foram submetidos somente ao TBI. O (PhSe_2) foi efetivo em aumentar os níveis séricos de magnésio, o que corrobora com seu efeito neuroprotetor, uma vez que os íons cálcio e magnésio estão presentes em vários mecanismos neuroquímicos do Sistema Nervoso Central (SNC). Somado a estas ações, o (PhSe_2) foi capaz de melhorar a aquisição e facilitação de memória,

demonstrando neuroproteção sobre os parâmetros comportamentais utilizados. De forma especial, quando o $(\text{PhSe})_2$ foi administrado antes e depois da indução do TBI. As habilidades locomotoras foram registradas em sessões-treinos e as alterações comportamentais pós-trauma foram realizadas 24 horas após indução do TBI e tratamentos. O $(\text{PhSe})_2$ melhorou a atividade locomotora observada no teste de campo aberto, demonstrando, ainda, um efeito ansiolítico, de modo especial quando o $(\text{PhSe})_2$ foi administrado antes e depois do TBI. Finalmente, o teste rota-rod reiterou os achados relacionados à locomoção observados no teste de campo aberto, com uma resposta de coordenação motora presente em ambos os tratamentos com $(\text{PhSe})_2$, porém, com distinção ao grupo que recebeu pré-tratamento e tratamento pós trauma. Diante disto, considerando a relevância deste estudo para o desenvolvimento de novos fármacos que possam diminuir o dano das células neurais e melhorar a recuperação de pacientes pós-trauma, diminuindo seqüelas, nossos resultados sugerem que os estudos sobre $(\text{PhSe})_2$ frente ao TBI possam ser aprofundados e melhor investigados para seu possível emprego como ferramenta farmacológica contra o TBI.

Palavras-chave: selênio, trauma encefálico, cálcio, magnésio, memória e atividade locomotora.

ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree

Toxicological Biochemistry Post-graduate Programme

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF DIPHENYL DISELENIDE ON MEMBRANE VIABILITY, MEMORY AND LOCOMOTOR ACTIVITY AFTER MECHANIC TRAUMA BRAIN INJURY (TBI) INDUCTION IN RATS

AUTHOR: Luís Flávio Souza de Oliveira

ADVISOR: Cristina Wayne Nogueira, PhD

CO-ADVISOR: João Batista Teixeira da Rocha, PhD

DATE AND PLACE OF THE DEFENSE: Santa Maria, 2008

Cerebral concussion and traumatic brain injury (TBI) are a disturbance of neural function frequently induced by a sudden acceleration and deceleration forces of the head with or without skull fracture. A large number of studies have shown that the TBI is associated with various primary events like glutamate release, elevated intracellular calcium, the formation of free radicals and subsequent lipid peroxidation as well as the decrease of serum magnesium contents, behavior disturbances, like memory loss and damage on locomotor activities. Such primary events may cause secondary damage by activating endogenous autodestructive biochemical processes. Diphenyl diselenide (PhSe)₂ is an organic selenium compound that has been demonstrated several biological effects that could be implicated in potential therapy to TBI. The aim of the present study was to evaluate the effects of the oral administration of (PhSe)₂ on TBI rat model, using ⁴⁵Ca⁺² uptake in cortex, striatum and hippocampus slices and serum magnesium concentration. Moreover, there were evaluate some behavioral aspects using startle test, conditioned fear and spontaneous alternation tasks to evaluate the acquisition and facilitation of memory; open field and rota-rod task to evaluate the neurolocomotor activity. The present study there was possible to verify at dose administered an increase in ⁴⁵Ca⁺² uptake by cerebral cortex, striatum and hippocampus slices in animals subjected to TBI and which received (PhSe)₂ treatment (100 mM 15 minutes

post TBI event), especially at the pretreatment group (20 mM by 3 days and 100 mM 15 minutes post TBI event) when compared to TBI group. (PhSe)₂ was effective to increase the serum magnesium levels concentration, which corroborate with its neuroprotective effect, once calcium and magnesium are present in several neurochemicals mechanism on Central Nervous System. Additionally, (PhSe)₂ was able to ameliorate the acquisition and facilitation of memory in behavioral tasks performed,. Especially, when the (PhSe)₂ was administered before and after to TBI. The neurolocomotor abilities were recorded at pre-training period (24h before to TBI). The behavioral changes in the open-field and rota-rod tasks were performed in 24 hours after TBI. (PhSe)₂ was able to increase the locomotor activity in open-field task suggesting anxiolytic-like effect too. When (PhSe)₂ was administered before and after to TBI. Finally, on rota-rod task reiterated the findings observed on open field, with a locomotor coordination response present in both (PhSe)₂ treatments, once more with distinction to pretreatment. Therefore, considering the relevance of this study on the development of new drugs that can decrease the neuronal damage and improve the patients recover post TBI, decreasing sequels, our results suggest that the studies with (PhSe)₂ against TBI could be more deeply investigated as a prospective pharmacological tools against TBI.

Key words: selenium, trauma brain injury, calcium, magnesium, memory, and locomotor activity.

LISTA DE FIGURAS

Fundamentação Teórica

Figura 1: Representação esquemática dos receptores glutamatérgicos 31

Figura 2: Estrutura química do disseleneto de difenila 42

Manuscrito I

Figure 1: Effect of (PhSe)₂ on specific ⁴⁵Ca⁺² uptake into rat cerebral cortex slices. Rat cerebral cortex was incubated with 0,7mM ⁴⁵Ca⁺² (0,68μCi). 53

Figure 2: Effect of (PhSe)₂ on specific ⁴⁵Ca⁺² uptake into rat cerebral striatum slices. Rat cerebral striatum were incubated with 0,7mM ⁴⁵Ca⁺² (0,68μCi). 54

Figure 3: Effect of (PhSe)₂ on specific ⁴⁵Ca⁺² uptake into rat cerebral hippocampus slices. Rat cerebral hippocampus were incubated with 0,7mM ⁴⁵Ca⁺² (0,68μCi). 55

Figure 4: Effect of (PhSe)₂ on serum magnesium concentration at different treatments TBI. 56

Manuscrito II

Figure 1: Length of latency freezing after sound stimulus delivery five times on pretraining task before of the TBI induction. 77

Figure 2: Latency to body movements on conditioned fear task. 78

Figure 3: Number of mictions on conditioned fear task. 79

Figure 4: Number of defections on conditioned fear task. 80

Figure 5: Deambulation on spontaneous alternation task (Y-maze). 81

Figure 6: Number of alternations on spontaneous alternation task (Y-maze). 82

Figure 7: Number of errors on spontaneous alternation task (Y-maze). 83

Manuscrito III

Figure 1: Chemical structure of diphenyl diselenide. 96

Figure 2A: Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected to TBI on total area entries from open field task on training day (1D) and test day (2D). 101

Figure 2B: Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected to TBI on rears from open field task on training day (1D) and test day (2D). 102

Figure 2C: Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected to TBI on stationary behavior from open field task on training day (1D) and test day (2D). 103

Figure 2D: Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected to TBI on central crossing from open field task on training day (1D) and test day (2D). 104

Figure 3A: Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected to TBI on the number of falls from rota-rod task on training day (1D) and test day (2D). 105

Figure 7: Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected to TBI on latency falls from rota-rod task on training day (1D) and test day (2D). 106

LISTA DE TABELAS

Manuscrito II

Table 1. Presence (p) or absence (a) of auditory sensibility when the rats were subjected to sound stimulus.	76
---	----

LISTA DE ESQUEMAS

Fundamentação Teórica

Esquema 1. Principais categorias qualitativas para memória humana e seus locais de processamento no SNC. 31

Esquema 2. Representação esquemática das aferências e eferências dos núcleos da base. 40

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA - Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

ANOVA - Análise de variância

APP – Proteína beta amilóide

bax – Proteína pró-apoptótica bax

bcl-2 – Proteína anti-apoptótica bcl-2

bcl-x – Proteína anti-apoptótica bcl-x

bim – Bisindolilmaleimida

BNDF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

c-fos – Proteína-quinase N-terminal c-fos

c-jun – Proteína-quinase N-terminal c-jun

$^{45}\text{Ca}^{+2}$ – Íon cálcio radiomarcado

CaMKII – Proteína-quinase dependente de cálcio-mudolina

5-HT – 5-Hidroxi-triptofano

5-HT_A – Receptor serotoninérgico tipo A

COX-2 – Ciclooxygenase isoforma 2

CREB – Elemento responsivo associado à proteína dependente de AMPc

D1 – Receptor dopaminérgico tipo 1

D2 – Receptor dopaminérgico tipo 2

DENATRAN – Departamento Nacional de Trânsito

GABA - Ácido γ (gama)-aminobutírico

GABA_A – Receptor gabaérgico tipo A

GAP-43 – Proteína 43 associada ao crescimento

GM-CSF – Fator estimulador do crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos

GMPc – Guanosina monofosfato cíclico

GPx - Glutathione peroxidase

GSF – Fator coadjuvante de crescimento

GSH - Glutathione reduzida

JNK – Proteína-quinase N-terminal

JNK3 – Proteína-quinase N-terminal isoforma 3

HSP-70 – Proteína de choque térmico - 70

IL1 – Interleucina 1

IL2 – Interleucina 2

IL6 – Interleucina 6

IL8 – Interleucina 8

MAPK – Proteínas-quinase ativáveis por agentes mitógenos

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócito – isoforma 1

MHC – I – Complexo de histocompatibilidade tipo I

Mn-SOD – Superóxido dismutase – isoenzima com grupo prostético manganês

NMDA - N-metil-D-aspartato

NFkB – Fator nuclear kappa B

NO – Óxido nítrico

p53 – Proteína p53

PAF – Projétil de arma de fogo

(PhSe)₂ - disseleneto de difenila

PKA – Proteínas-quinase dependentes de AMPc

PKC – Proteínas-quinase dependentes de cálcio

PKG – Proteínas-quinase dependentes de GMPc

SNC - sistema nervoso central

TBI – Trauma crânio-encefálico

TNF α – Fator necrótico tumoral α (alfa)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	05
RESUMO	06
ABSTRACT.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELA.....	11
LISTA DE ESQUEMAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS.....	13
APRESENTAÇÃO.....	20
INTRODUÇÃO.....	21
1. OBJETIVOS.....	23
1.1 Objetivo Geral.....	23
1.2 Objetivos Específicos.....	23
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
2.1 Aspectos Gerais.....	24
2.2 Aspectos Fisiopatológicos do Trauma Encefálico.....	26
2.3 Papel do Cálcio na Fisiopatologia do Trauma Encefálico.....	28
2.3.1 Outros bio-sinalizadores do trauma encefálico.....	30
2.4 Papel do Magnésio na Fisiopatologia do Trauma Encefálico.....	31
2.5 Complicações do Trauma Encefálico.....	32
2.6 Aspectos Cognitivos e Locomotores.....	33
2.6.1 Aprendizado e memória.....	33
2.6.2 Neurolocomoção.....	41
2.7 Selênio e Compostos Orgânicos à Base de Selênio.....	45
2.7.1 Selênio.....	45
2.7.2 Ebselen.....	47
2.7.3 Disseleneto de Difenila.....	49
3. MANUSCRITOS.....	51

3.1 Manuscrito I.....	52
3.2 Manuscrito II.....	71
3.3 Manuscrito III.....	98
4. DISCUSSÃO.....	119
5. CONCLUSÕES.....	130
6. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	131
7. REFERÊNCIAS.....	133

APRESENTAÇÃO

Os resultados presentes nesta tese estão apresentados sob forma de manuscritos, os quais encontram-se no item MANUSCRITOS CIENTÍFICOS. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão dos Resultados, assim como as Referências Bibliográficas encontram-se nos próprios manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens DISCUSSÃO E CONCLUSÕES, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os manuscritos científicos contidos neste trabalho.

O item denominado de REFERÊNCIAS diz respeito somente às citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO, FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA e DISCUSSÃO desta tese.

INTRODUÇÃO

Os acidentes automobilísticos, assim como os de ordem doméstica e esportiva, constituem causa relevante de neurotrauma entre a população mundial.

As lesões presentes nesse tipo de evento estão relacionadas às forças mecânicas e vetoriais que impactam no sistema nervoso central (SNC), podendo conduzir à presença de seqüelas debilitantes e irreversíveis. Estas, por sua vez, podem ser geradas da lesão primária, criadas a partir do impacto ou de forças dinâmicas e vetoriais; como também, podem advir das lesões secundárias, as quais estão relacionadas aos eventos posteriores à lesão primária, cooperando com alterações morfológicas e moleculares do tecido.

Sendo assim, é compreensível que lesões que acometem o SNC possam alterar comportamento, capacidade cognitiva e motora de indivíduos vitimizados, uma vez que estruturas celulares são danificadas e seu metabolismo alterado. Por consequência, as lesões acabam por induzir a um extenso programa de eventos bioquímicos e sinalizadores de resposta celular à lesão, intermediados pela ação de enzimas, proteínas, fatores nucleares, neurotransmissores, hormônios, íons, dentre outros.

Desafortunadamente, até o momento, não se dispõe de um arsenal molecular satisfatório para ser empregado na terapêutica dos traumas cranioencefálicos, que sejam hábeis o bastante para refrear a atividade de substâncias endógenas que potencializam os efeitos lesivos a partir dos

traumas, e, preferencialmente, capazes de estimular mecanismos regeneradores. O tratamento disponível é genuinamente sintomático.

Por outro lado, há algum tempo que compostos orgânicos à base de selênio têm apresentado vários efeitos biológicos relevantes, referenciados por suas propriedades antioxidante, antiinflamatória, citoprotetora, cicatrizante, dentre outras. Destacamos um destes compostos, o disseleneto de difenila, o qual é objeto de estudo desta tese, que se propôs verificar se esta molécula seria capaz de proporcionar alguma ação neuroprotetora após indução de trauma mecanoencefálico em ratos, de modo especial sobre a proteção da membrana celular de fatias de hipocampo, estriado e córtex cerebral através do estudo da recaptação de $^{45}\text{Ca}^{+2}$, de testes comportamentais para avaliação da aquisição e facilitação de memória, e da condição neurolocomotora.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral:

Avaliar o possível efeito neuroprotetor do disseleneto de difenila em ratos submetidos a modelo de trauma mecano-encefálico, com foco sobre a captação de cálcio, aquisição e facilitação de memória, e atividade locomotora.

1.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar a capacidade de captação de cálcio em fatias de córtex cerebral, estriado e hipocampo de ratos submetidos a trauma mecano-encefálico e tratados com disseleneto de difenila;
- Avaliar a concentração sérica de magnésio livre em ratos submetidos a trauma mecano-encefálico e tratados com disseleneto de difenila;
- Avaliar a aquisição de memória de curta duração em ratos submetidos a trauma mecano-encefálico e tratados com disseleneto de difenila;
- Avaliar a aquisição e facilitação de memória de longa duração em ratos submetidos a trauma mecano-encefálico e tratados com disseleneto de difenila;
- Avaliar a neuromotricidade de em ratos submetidos a trauma mecano-encefálico e tratados com disseleneto de difenila.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Gerais

O sistema nervoso central (SNC) contém em si estruturas extremamente importantes sob o ponto de vista fisiológico, contudo não menos sensíveis e frágeis. Em função disso, tanto o encéfalo quanto a medula espinhal estão encerrados em estruturas ósseas resistentes, ou seja, o crânio e a coluna vertebral, os quais têm como principal função proteger os órgãos do SNC de traumas (FREIRE, 2001).

Outro fato interessante em relação ao SNC é que algumas características celulares e composição bioquímica da matriz extracelular diferem dos outros tecidos em vários aspectos, tais como tipos celulares e substâncias bio-sinalizadoras que, diante de situação de estresse e/ou lesão traumática acionam e protagonizam mecanismos complexos de resposta (SHAW, 2002; GAETZ, 2004).

Os traumas crânio-encefálicos constituem uma importante parcela dentro das *causas mortis* com características relacionadas à violência, especialmente em cidades grandes, onde os traumatismos por projétil de arma de fogo (PAF) e acidentes de trânsito se evidenciam quando comparados a qualquer outra natureza de etiologia traumática, como as ocorridas por processos cirúrgicos, quedas e colisões domésticas, bem como choques mecânicos em esportes de contato (HÉRCULES, 1997; KRAUS & NOURJAH, 1998; JAVOUHEY, GUÉRIN & CHIRON, 2006).

As lesões crânio-encefálicas são, essencialmente, dependentes de forças mecânicas que atuam sobre o SNC. Estas, por sua vez, podem ser estáticas ou dinâmicas. As estáticas se constituem em uma modalidade de força onde a mesma se projeta de forma gradual e lenta sobre um determinado corpo, ocorrendo com uma frequência bem menor que a dinâmica. Já o trauma gerado a partir de força dinâmica, bem mais comum no dia a dia do setor de emergência hospitalar, pode se manifestar de três formas, que são: impulso, provocado única e exclusivamente por forças de aceleração e desaceleração sobre estruturas nervosas; impulso com impacto, onde, além das forças de aceleração e desaceleração, está presente o impacto por objeto, geralmente obtuso; e impacto, gerado por força de contato mecânico com objetos, obtusos ou não, podendo esta, inclusive, estar associada a processos cirúrgicos efetuados no SNC. Nestes três mecanismos, o tecido nervoso pode se deslocar em vários sentidos, o que possibilita a ruptura e lesão de estruturas interligadas (FREIRE, 2001; SHAW, 2002).

Como dito anteriormente, boa parte dos casos de traumas crânio-encefálicos é gerada a partir de acidentes de trânsito. De fato, no Brasil, segundo o Departamento Nacional de Trânsito (DENATRAN), na década de 1980, 26,903 pessoas perderam a vida em acidentes de trânsito. Os últimos levantamentos publicados revelaram que no ano de 2005 tivemos 26.409 vítimas fatais e 513,510 vítimas não fatais em acidentes de trânsito, quadro que gera um custo considerável à gestão de saúde pública. Só até 2001, a Previdência Social do Brasil gastava cerca de US\$ 5 bilhões por ano com despesas médico-hospitalares em função de acidentes de trânsito, sendo que 62% dos leitos hospitalares eram ocupados por vítimas destes sinistros. Neste

levantamento, não foram considerados os custos que envolvem a terapia para as seqüelas provocadas pelos acidentes (DENATRAN, 2005).

Como se pode perceber, os acidentes de trânsito revelam-se como grande fonte geradora de traumas crânio-encefálicos. De qualquer forma, a partir da lesão gerada pelo trauma, uma série de mecanismos celulares e moleculares passa a ser acionada para dar início à tentativa de restauração tecidual.

2.2 Aspectos Fisiopatológicos do Trauma Encefálico

Em relação ao comportamento da população celular após trauma crânio-encefálico, percebe-se um aumento, dentro das primeiras 24 horas da população de neutrófilos - a qual é dependente do grau de edema gerado; e macrófagos, que são posteriormente substituídos pelas células da glia (FREIRE, 2001; VRIE et al., 2002). Essas células secretam várias citocinas, tais como fator necrótico tumoral-alfa (TNF- α) e Interleucinas (IL)-1 e 6, que parecem estar relacionadas com os mecanismos fisiopatológicos desenvolvidos a partir das lesões crânio-encefálicas (FREIRE, 2001).

Um grande número de estudos tem revelado que o trauma encefálico está associado a eventos de liberação de glutamato, elevação das concentrações de cálcio intracelular, ácidos graxos livres, formação de radicais livres com subsequente lipoperoxidação (PHOL et al., 1999; ROSA et al., 2004; PLATT, 2007), assim como uma diminuição nos níveis séricos de magnésio (HEALTH & VINK, 1996). Todos esses eventos primários acionados a partir do

trauma podem causar danos secundários pela ativação endógena de processos bioquímicos autodestrutivos. No entanto, as mudanças bioquímicas primárias que se seguem ao trauma e que causam injúria tecidual secundária e morte celular, especialmente aos aspectos cronológicos envolvidos, ainda não estão completamente esclarecidas (KRAUS & NOURJAH, 1998).

Contudo, é bem estabelecido que o aumento nas concentrações de glutamato presente no trauma encefálico, coopera com o aumento do influxo de cálcio celular, especialmente via receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA), conforme Figura 1A, o que acaba desencadeando uma série de reações autodestrutivas para célula (NICHOLLS & ATTWELL, 1990; SONNEWALD, WESTERGAARD & SCHOUSBOE, 1997; SHON, KIM & GWAG, 1998; CHOI, 1998). O aumento da entrada de cálcio nas células, por sua vez, pode não estar somente relacionado à ativação de NMDA, mas também, paralelamente ou não, ao defeito mecânico da membrana celular produzido pelo trauma, ou ainda por ativação de canais cálcio-dependentes por despolarização celular que não do tipo NMDA (FREIRE, 2001).

De qualquer forma, o aumento de cálcio intracelular traz mudanças drásticas na fisiologia das células, uma vez que este íon é um importante mensageiro intracelular, responsável por regular uma série de funções, tais como a excitabilidade, a exocitose, a liberação de neurotransmissores na fenda sináptica, dentre outras (BERRIDGE, LIPP & BOOTMAN, 2000; FLOREA et al., 2005).

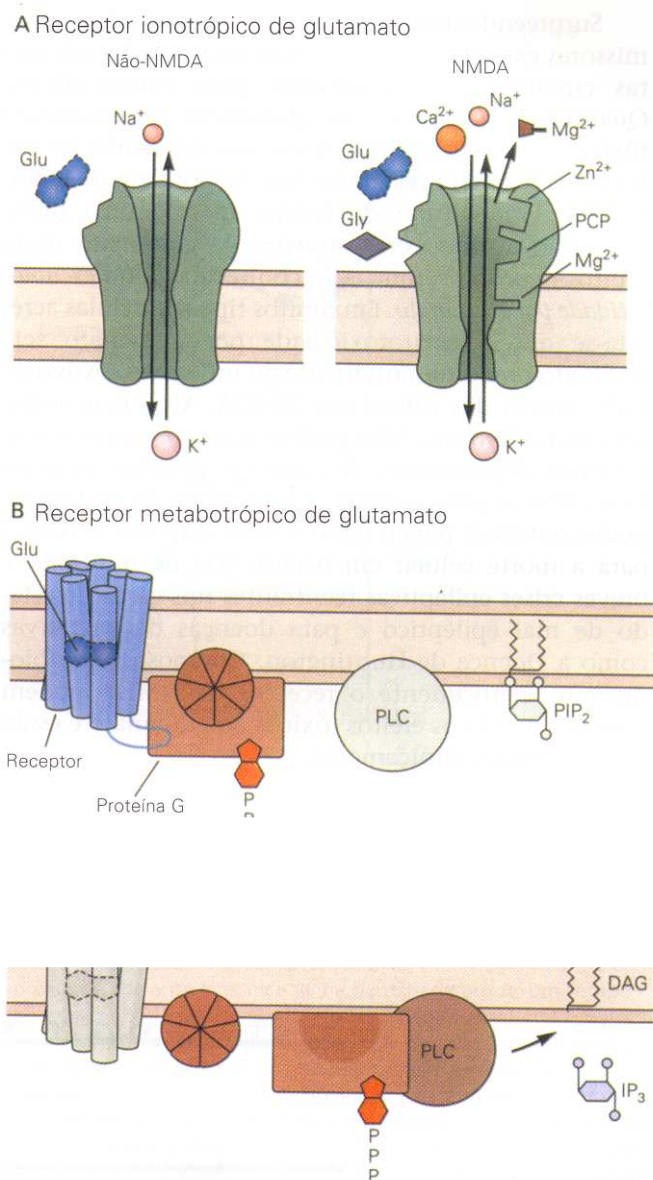


Figura 1. Representação esquemática de três classes de receptores glutamatérgicos; A – Dois tipos de receptores glutamatérgicos ionotrópicos; B – Receptor metabotrópico glutamatérgico e a intermediação da resposta pela PLC.

Fonte: Princípios da Neurociência, 2003, p.213.

2.3 Papel do Cálcio na Fisiopatologia do Trauma Encefálico

As células nervosas possuem mecanismos especializados na homeostase e regulação fina dos níveis citosólicos de cálcio livre. Em seu estado de

repouso, os níveis de cálcio livre são mantidos em torno de 100 nM, usando para isso, influxo e efluxo através de canais e bombas dispostos na membrana celular, retículo endoplasmático e mitocôndrias. Fisiologicamente, ocorrem flutuações nos níveis citoplasmáticos de cálcio, já que estão presentes na sinalização de múltiplas cascatas bioquímicas em uma mesma célula. No entanto, se a elevação de cálcio livre se mantém nessa condição, este mesmo íon pode ativar mecanismos apoptóticos celulares que inclui ativação de proteases, fosfolipases, endonucleases e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Estes eventos uma vez acionados, associados ou não, podem conduzir a célula à morte (BERRIDGE, LIPP & BOOTMAN, 2000; FLOREA et al., 2005).

Um dos eventos associados ao cálcio e ao estresse oxidativo, provocado ou não pelo aumento das concentrações de glutamato, é o aumento da expressão do fator nuclear kappa B (NFkB), capaz de regular a ativação de diferentes genes e em vários tipos de célula, onde, dentre elas, cita-se: astrócito, micróglia e células de Schwann (GRILLI & MEMO, 1999; MEBERG et al., 1996).

A participação do NFkB se faz ainda mais evidente quando nos reportamos a eventos que denotem prejuízo na homeostase celular, haja visto estar envolvido a expressão/regulação de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- α , GM-CSF, GSF), de quimiocinas (MCP-1, IL-8), MHC-I, da óxido nítrico sintase induzível, da COX-2, da Mn-SOD do APP, p53, dentre outros (GRILLI & MEMO, 1999; NAIR, 2006). A ativação dessas substâncias, por sua vez, coopera com a ativação de caspases e outras enzimas apoptóticas, podendo ter como estímulo inicial, vários eventos, tais como a isquemia, a esclerose

múltipla, a doença de Alzheimer, o mal de Parkinson, bem como o trauma encefálico (BRODSKY & GEALEKMAN, 2004; PLATT, 2007).

2.3.1 Outros biossinalizadores da fisiopatologia do trauma encefálico

Além do NFkB, outra importante substância reguladora em processos apoptóticos e de lesão neuronais é a JNK, pertencente a superfamília das MAPK (HAM et al., 2000; DAVIS, 2000), sendo a isoforma JNK3 mais expressada em células cardíacas e nervosas (RESNICK & FENNELL, 2004). Vários estudos têm demonstrado o envolvimento da JNK na regulação/expressão de vários fatores de transcrição, como c-jun, membros da família bcl-2 (bcl-2, bcl-x, bim e bax), como também de TNF- α . Este último fator é, na verdade, uma citocina multifuncional associada à defesa e resposta homeostásica frente à injúria tecidual. Todas essas ativações proporcionadas por JNK3 acabam por confirmar seu envolvimento em processos de lesão celular e de apoptose (LIN, 2002).

A biossinalização que ocorre em resposta à lesão celular com os íons, fatores de transcrição, enzimas, citocinas e quimiocinas acima citados, compreendem uma maquinaria celular interessante, onde uma harmoniosa inter-relação acaba por culminar na resposta apoptótica em si pela ativação de caspases que, por sua vez, ativam endonucleases e DNAases gerando, assim, fragmentação do material genético da célula (SINGH & DIKSHIT, 2007).

Outro evento relacionado ao trauma encefálico é a produção de radicais livres e, dentre os radicais gerados, queremos chamar atenção aos derivados

do óxido nítrico, já que o tecido nervoso expressa todas as isoformas da óxido nítrico sintase, contudo, a isoforma induzível ganha destaque ao mostrar-se quantitativamente superior na produção de NO que a isoforma constitutiva, além de ser estimulada pelas citocinas inflamatórias, como a IL-1, e o fator nuclear TNF- α permanecendo ativa por várias horas ou até mesmo dias (XIE & NATHAN, 1994).

2.4 Papel do Magnésio na Fisiopatologia do Trauma Encefálico

Outro marcador que tem sido proposto para avaliar quadros neurotraumáticos é o magnésio. Alguns estudos usando espectroscopia por ressonância magnética ou absorção atômica sugerem que o Mg^{+2} tem um importante papel na fisiopatologia do neurotrauma. Além disso, tem sido bem aceito que após trauma mecano-encefálico, a concentração de magnésio livre diminui no tecido nervoso central e aumenta na corrente sangüínea. Este declínio da concentração de magnésio livre no SNC desencadeia alterações pós-lesionais ligadas à liberação de neurotransmissores, de modo especial o glutamato, com aumento da atividade de receptores NMDA e canais de cálcio; também ligadas à deflagração de estresse oxidativo; aumento da formação de edema; aumento da permeabilidade dos poros transitórios mitocondriais; e ao prejuízo na capacidade bioenergética do tecido (KAHRAMAN et al., 2003; VINK et al., 2003). Por outro lado, alguns estudos realizados focando a administração de magnésio após indução de trauma, revelaram uma melhora no déficit neurolocomotor e de memória provocado pelo processo traumático, assim como efeito inibitório sobre genes que expressam proteína c-fos, neurotrofinas,

ciclooxigenase-2 (COX-2) e proteínas de choque térmico 70 (HSP-70), os quais estão envolvidos em respostas inflamatórias e apoptóticas celulares (ALTURA et al., 2003; KINOSHITA et al., 2001).

De fato, ao magnésio sérico livre é atribuído um efeito regulador do processo apoptótico, justamente por sua ação moduladora sobre os receptores NMDA de forma antagônica e não competitiva. Esta regulação permite que não se deflagre a ativação de caspases por intermediação de receptores de NMDA, as quais são a família de enzimas centrais no processo apoptótico, de modo especial sobre as proteínas estruturais e do material genético celular (McDONALD et al., 1990; PAPADOPOULOS et al., 1998; MISHRA & PAPADOPOULOS, 1999; TÜRKYILMAZ et al., 2002). Associado a isso, também é sugerido que o magnésio seja capaz de regular o processo apoptótico cerebral pelo controle que exerce sobre proteínas da membrana nuclear, diminuindo a atividade nuclear intermediada pela ativação de proteínas e fatores de ativação nuclear (RAVISHANKAR et al., 2001).

2.5 Complicações do Trauma Encefálico

As lesões crânio-encefálicas, além de outras complicações neurológicas, resultam num evidenciado déficit de atenção nos indivíduos traumatizados. Os danos relacionados a este déficit parecem ter uma estreita relação com as áreas do lobo frontal, parietal e região estriatal. Todavia, uma vez que seja considerada a movimentação do encéfalo durante o evento traumático, é possível admitir que outras regiões sejam afetadas. E, por conseqüência,

outras funções que são coordenadas pelo encéfalo podem passar a ter prejuízo, como a capacidade exploratória, a capacidade cognitiva, o humor, a locomoção e o controle de movimentos, dentre outras (FREIRE, 2001; SHAW, 2002; GAETZ, 2004; SINGH & DIKSHIT, 2007).

Para entender melhor a proposta deste trabalho, abordaremos a seguir aspectos relacionados à memória e locomoção.

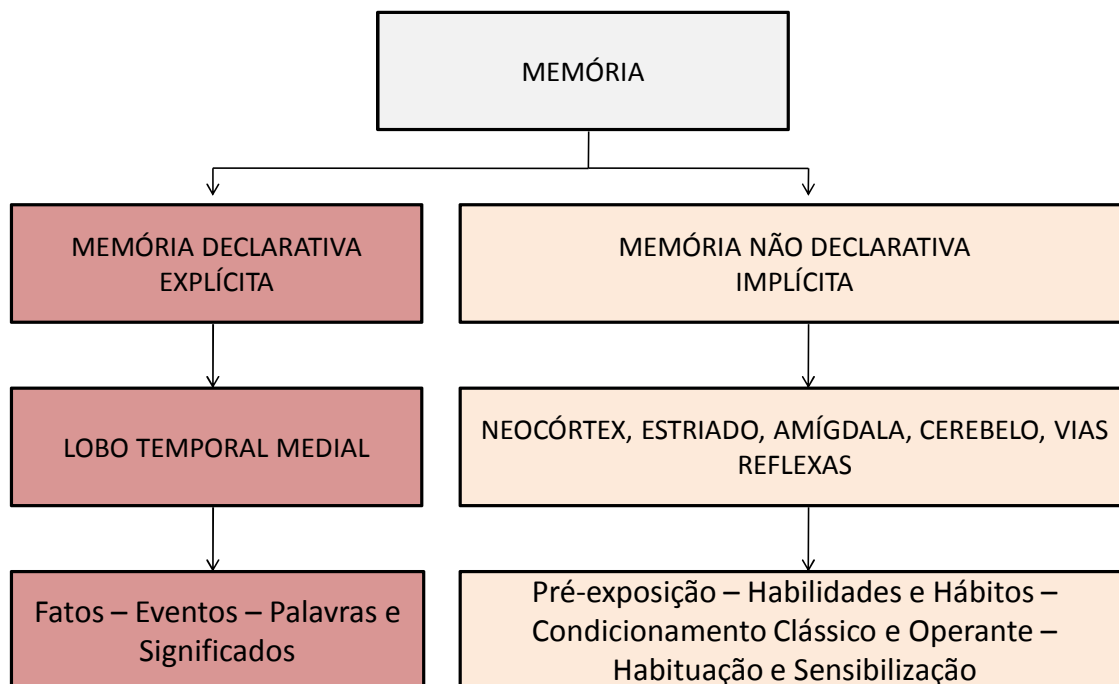
2.6 Aspectos Cognitivos e Locomotores

2.6.1 Aprendizado e memória

O comportamento animal e humano é dependente de aspectos genéticos, através da conservação, alteração ou supressão de genes, assim como pela modulação oferecida por estímulos presentes no ambiente. Sendo assim, é vital aos animais e ao homem que sejam hábeis em captar as informações provenientes do meio e consigam responder adequadamente a estímulos. Para que isto aconteça, é necessário lançar mão de dois mecanismos neurais, que são o aprendizado e a memória. O primeiro está relacionado ao mecanismo de aquisição de conhecimento a respeito de algo ou alguém, interligado a determinado contexto. Já o segundo, se reporta ao processo pelo qual este conhecimento é codificado, conservado e, posteriormente, recuperado ou evocado (IZQUIERDO, 2002; KANDEL, SCHWARTZ & JESSELL, 2003).

Os autores costumam adotar uma classificação à memória, o que acaba facilitando o entendimento e o estudo sobre o assunto. Sendo assim, a

memória costuma ser tratada como: memória implícita, também denominada de não declarativa ou procedural, memória explícita, também chamada de declarativa (Esquema 1); memória episódica ou semântica; memória de trabalho; memória de curta ou longa duração e, ainda, memória remota (SCHACTER^a, 1997; KANDEL, SCHWARTZ & JESSELL, 2003).



Esquema 1. Principais categorias qualitativas para memória humana e seus locais de processamento no SNC.

A memória implícita está amplamente relacionada a condicionamentos, habilidades reflexas motoras ou que envolvam percepção de algo, cuja evocação se dá de forma inconsciente. Já no caso da memória explícita, se trabalha com a significância de lugares, coisas ou indivíduos dentro de uma contextualização vivenciada, e que geraram memória. Este último tipo de

memória é bastante flexível e dependente de associações de vários fragmentos de informações. Contudo, a memória implícita tende a ser dotada de rigidez e diretamente relacionada à intensidade e condições que se processou a aprendizagem referente aos estímulos adotados ou oferecidos (TULVING & SCHACTER, 1990; SQUIRE et al., 1992; GABRIELI^a et al., 1995; RUSSO, FOX & BOWLES, 1999).

As memórias episódica e semântica se reportam, respectivamente, à capacidade de recordar-se de eventos temporais e/ou experiências pessoais, e fatos objetivos. Assim, usando da memória episódica, é possível trazer à tona recordações de fatos que marcaram a vida pessoal ou coletiva. Todavia, ao se fazer uso da evocação da memória semântica, é possível recordar-se de conhecimentos objetivos que se aprendem na academia, em livros, dentre outros (SCHACTER^b, 1992; EUSTACHE et al., 1997; VERFAELLIE et al., 2000; TULVING, 2002; KESNER et al., 2002; EICHENBAUM, 2004).

Muito embora a formação de memória seja intimamente ligada ao número de associações e interações possíveis ao nível de SNC, se tem utilizado os termos associativa e não-associativa para estudar a memória implícita em modelos experimentais. A memória implícita, como já citado anteriormente, é aquela relacionada a procedimentos, que quando relacionada à exposição única ou repetida a somente um tipo de estímulo, se diz que a aprendizagem a partir deste estímulo é não-associativa. Este tipo de aprendizagem, por sua vez, envolve os conceitos de habituação, que se refere à diminuição gradual de resposta frente a um estímulo constante; sensibilização, que pode ser entendido como um aumento da resposta a determinado estímulo, como um estímulo intenso e/ou doloroso; e

desabituação, relacionado a estímulos que se sobrepõem à habituação, sensibilizando o indivíduo à resposta intensificada quando submetido a determinado estímulo. Por outro lado, quando o indivíduo recebe mais de um estímulo para aprender determinada tarefa ou identificar determinado contexto, se diz que sua memória implícita foi desenvolvida de forma associativa (SCHACTER^b, 1992; VIANNA^a et al., 2001; ROSSATO^a et al., 2006).

Quanto ao aspecto cronológico, a memória pode ser de curta ou longa duração, podendo as explícitas ou declarativas durar de minutos a décadas, e as implícitas ou não-declarativas, normalmente, a vida toda do indivíduo. Em relação às memórias declarativas, é possível afirmar que precisam de um determinado tempo para serem consolidadas, ou seja, fixadas de maneira definitiva, o que implica passar pelo período correspondente à memória de curta duração, que acontece em algumas horas após à aquisição de memória. Passado este período, se inicia a geração da memória de longa duração (THOMPSON & KIM, 1996; BAILEY, BARTSCH & KANDEL, 1996).

O processo que conduz à consolidação pode gerar uma memória temporária, se a memória não for adequadamente fixada e/ou requisitada, uma vez que este processo pode sofrer interferências que concorrem ao prejuízo da consolidação, como traumatismos cranianos, eletrochoques, a ação de determinados fármacos ou drogas. Todavia, tanto a memória de curta quanto a de longa duração se valem das mesmas estruturas nervosas para que se estabeleçam, porém, com mecanismos bioquímicos distintos (BAILEY, BARTSCH & KANDEL, 1996; KANDEL, SCHWARTZ & JESSELL, 2003).

Em relação aos aspectos morfológicos, algumas estruturas encefálicas ganham destaque na formação e consolidação de memória, bem como aos tipos de memória relacionados. Neste sentido, os estudos realizados ao longo dos anos, tanto em humanos quanto em animais de experimentação, têm demonstrado que a memória é fruto da participação de várias áreas cerebrais, e que não agem pura e isoladamente, mas em associação (GABRIELI^b et al., 1998; MESULAM, 1999; ROSSATO^a et al., 2006).

No caso da memória implícita e não-declarativa, o neocórtex é fundamental para gerar memória a partir de pré-exposição; o estriado parece ter um forte apelo quanto aos aspectos relacionados à aquisição de habilidades expressas em operações procedimentais; a amígdala parece ter um envolvimento bastante importante nas respostas moduladas pelas emoções, principalmente aquelas que envolvem o aprendizado associativo, assim como o cerebelo, que está envolvido na resposta da musculatura esquelética em aprendizagem associativa; Já a aprendizagem implícita não-associativa, envolvendo a habituação e sensibilização, se vale das vias reflexas para respostas apropriadas (ROSSATO^b et al., 2006; IZQUIERDO et al., 2008; BEVILAQUA et al., 2008).

Em se tratando de memória explícita, o fluxo de informações parece ser mais elaborado e complexo, iniciando pelo processamento da informação por um ou mais córtices associativos, em especial o pré-frontal, o límbico e o parieto-occipito-temporal, para posteriormente conduzir a informação ou o novo dado aos córtices parahipocampal, perirrinal e entorrinal, ao giro denteado, ao hipocampo e ao subículo. Nesta fase, o hipocampo parece ter um papel relevante na memória espacial e de mediar inicialmente a retenção de memória

de longo prazo. Todavia, a informação após alcançar as áreas hipocampais, de modo especial às áreas CA3 e CA1, retorna ao córtex entorrinal que, por sua vez, a remete aos córtices parahipocampal e perirrinal e, estes, às áreas associativas do neocórtex. E é justamente neste último que a memória explícita de longo prazo passa a ser definitivamente consolidada (MESULAM, 1999; KANDEL, SCHWARTZ & JESSELL, 2003; HASSELMO & EICHENBAUM, 2005).

Na consolidação de memória de longa duração existe um caminho neuroquímico singular para efetivá-la. Inicialmente, as células hipocampais recebem estimulação glutamatérgica via receptores AMPA (ácido amino-hidroximetil-isoxazol-propiónico), que conduz a uma despolarização contínua da célula pelo influxo de sódio. Como consequência desta despolarização, ocorre o deslocamento do íon magnésio que obtura a entrada de cálcio do receptor glutamatérgico NMDA, o que favorece o influxo de cálcio. Este aumento de cálcio citosólico também acontece em outras áreas do encéfalo que não o hipocampo, porém, através de receptores glutamatérgicos metabotrópicos. De qualquer forma, o aumento de cálcio no citoplasma estimula direta ou indiretamente várias proteínas-quinase, dentre elas cita-se: CaMKII (proteína-quinase cálcio-calmodulina dependente), PKC (proteínas-quinase cálcio dependentes), PKG (proteínas-quinase dependentes de GMPc), PKA (proteínas-quinase dependentes de AMPc) e as MAPK - proteínas-quinase ativáveis por agentes mitógenos (IZQUIERDO, 2002; MEANS, 2008; BEKINSCHTEIN et al., 2008).

A ativação dessas proteínas-quinase conduz à fosforilação e, neste caso, ativação de receptores glutamatérgicos pré e pós-sinápticos, como

também de fatores de transcrição. Sabe-se, por exemplo, que a PKG e PKC estão envolvidas na fase mais precoce do processo de consolidação de memória de longa duração, tendo a primeira um papel estimulador da transmissão glutamatérgica via produção de óxido nítrico, e a segunda via produção de GAP-43. A PKC, na verdade, além de estimular a liberação de glutamato ao nível pré-sináptico, se faz presente em processos pós-sinápticos fosforilando receptores glutamatérgicos (IZQUIERDO, 2002; XIAO, GUSTAFSSON & NIU, 2006).

Por outro lado, a CaMKII induz a ativação de receptor AMPA por várias horas após a indução de memória de longa duração; já as proteínas MAPK e PKA, apesar de também fosforilarem receptores glutamatérgicos, parecem ter sua ação mais centrada na fosforilação de fatores de transcrição de 2 a 6 horas após o estímulo inicial, tendo como principal alvo molecular o fator de transcrição CREB (elemento responsivo associado à proteína dependente de AMPc). Este fator de transcrição estimula a síntese de proteínas que estão relacionadas à adesão celular, as quais são transportadas para a área sináptica, de forma a induzir alterações na superfície da célula nervosa, podendo tanto aumentar quanto reduzir sua área e, com isso, modular a resposta a determinado estímulo cooperando para consolidação da memória de longa duração (BERNABEU et al., 1997; LOMBROSO, 2004; ALONSO et al., 2005; MEANS, 2008).

Além do glutamato, outros neurotransmissores estão envolvidos no processo de formação de memória de longa duração, como o GABA (ácido gama-aminobutírico), acetilcolina, noradrenalina, dopamina e serotonina (5-hidroxi-triptofano, 5-HT). O GABA e a serotonina, ao agirem respectivamente

sobre os receptores GABA_A e 5-HT_A no hipocampo e córtex entorrinal inibem o processo de consolidação de memória. Por outro lado, a acetilcolina, a noradrenalina e a dopamina, ao agirem sobre seus respectivos receptores hipocampais e córtico-entorrinais muscarínicos, noradrenérgicos do tipo beta e dopaminérgicos do tipo D1 e D2 estimulam a facilitação e consolidação de memória de longa duração intermediada pelo sistema hipocampal e suas conexões, com uma necessidade temporal de, pelo menos, 6 horas. Até atingir o “status” de consolidação de memória, o processo é bastante lábil e passível de sofrer alterações por inúmeras variáveis (VIANNA^b et al., 2001; IZQUIERDO, 2002; BRINTON et al., 2008).

Em se tratando de formação de memória de curta duração, ocorrem algumas diferenciações de mecanismos quando comparada à memória de longa duração. O hipocampo, de modo especial a subárea correspondente à CA1, o córtex entorrinal e parietal têm demonstrado serem cruciais na formação de memória de curta duração. Estas três estruturas são inibidas pela ação gabaérgica sobre receptores GABA_A e são estimuladas de formas distintas no que se refere à ação neurotransmissora e de seus receptores associados. Na subárea CA1, os receptores glutamatérgicos AMPA, NMDA e metabotrópicos são modulados positivamente pela ação colinérgica, noradrenérgica e dopaminérgica através de seus respectivos receptores muscarínicos, β -noradrenérgicos e D1. Todavia, os receptores glutamatérgicos sofrem modulação negativa através da ação serotoninérgica sobre receptores 5-HT_A (IZQUIERDO, 2002; XIAU, GUSTAFSSON & NIU, 2006; KALUEFF & MURPHY, 2007).

No que se refere à participação dos córtices entorrinal e parietal posterior na formação de memória de curta duração se tem observado a necessidade da estimulação de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA, não havendo interferência da ausência de estímulo sobre os outros tipos de receptores glutamatérgicos na formação desse tipo de memória. E, de modo interessante, ao contrário do que se processa em CA1, no córtex entorrinal a ação serotoninérgica sobre 5-HT_A resulta em modulação positiva sobre receptores AMPA (VIANNA^c et al., 2000; IZQUIERDO, 2002)

Em relação às proteínas-quinase e sua participação na formação de memória de curta duração, os estudos têm apontado para ação de diferentes isoenzimas de PKC, que são requisitadas no mesmo período de tempo, tanto nas regiões pré-sinápticas do hipocampo (isoformas α e β -II), quanto no córtex entorrinal. E, apesar de não haver intervenção de PKG e CaMKII em nenhuma dessas estruturas, existe a necessidade de ação da guanilato ciclase em CA1 para a formação de memória de curta duração, bem como da participação de PKA nos primeiros 90 minutos para formação da memória de curta duração em roedores. Curiosamente, não são necessários o envolvimento do CREB, nem a atividade de síntese protéica no tecido hipocampal para que se transcorra a aquisição de memória de curta duração (IZQUIERDO, 2002; KANDEL, SCHWARTZ & JESSELL, 2003).

2.6.2 Neurolocomoção

Os sistemas nervosos central e periférico, de forma conjunta e cooperativa, se relacionam com o meio externo a partir das informações processadas e armazenadas do meio ambiente. No que se refere ao sistema

neurolocomotor, se percebe o envolvimento da medula espinal, do tronco encefálico e dos sistemas neurais encefálicos, tanto corticais quanto estriatais, bem como de respostas neurais reflexas a determinados estímulos, resultando ora em movimentos finos, ora em movimentos menos elaborados, conforme o caso (PURVES et al., 2001).

De fato, a medula espinal é capaz de proporcionar movimentos simples e coordenados em função de seus circuitos neurais, acionados com frequência nos estímulos reflexos, que por sua vez, não diferem dos movimentos voluntários, mas ocupam uma circuitaria sensória de entrada específica, capaz de gerar respostas adaptadas de acordo com o estímulo recebido (GUYTON & HALL, 2006).

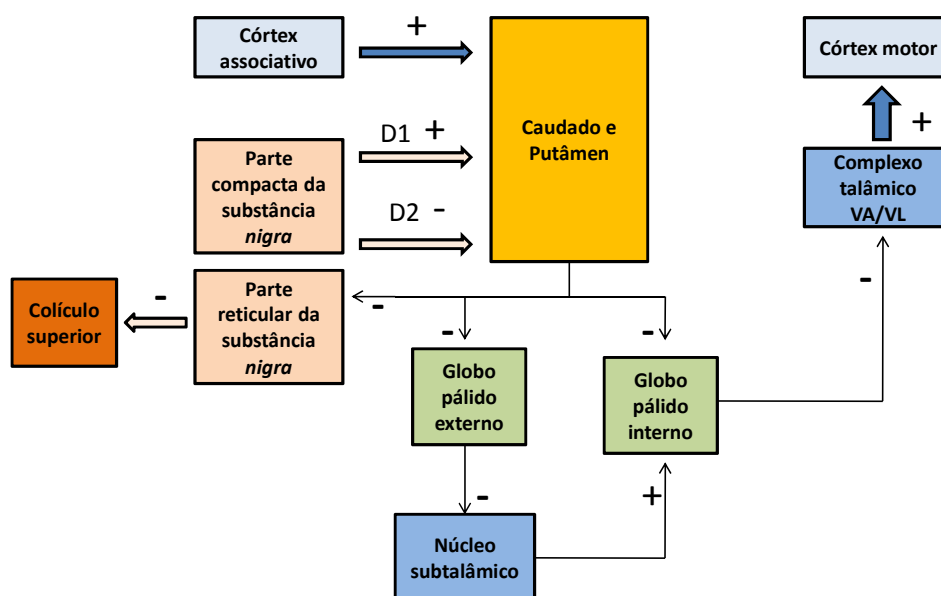
O fluxo de informações e respostas motoras, como já citado anteriormente, se dá de forma distinta, onde o tronco encefálico exerce um papel intermediador de informações, tanto aferentes quanto eferentes. O tronco, em conformidade com os estímulos espinais, modula a postura e locomoção. Por outro lado, as eferências iniciadas ao nível de córtices necessitam passar pelo tronco para chegar à medula espinal e coordenar movimentos voluntários, sejam eles movimentos finos e complexos ou não. Para desenvolver os movimentos voluntários, os córtices motores acabam por envolver outras áreas do encéfalo e, dessa forma, não são exclusivamente dependentes das informações do sistema somatosensorial ou nociceptivo. Todavia, utiliza da capacidade de memória e de informações já processadas e armazenadas para gerar movimentos relevantes e condizentes à necessidade imposta, o que pode ser constantemente aprimorado por contínua aprendizagem e geração de memória implícita. Além disso, áreas subcorticais

como o cerebelo e os núcleos da base têm papéis imprescindíveis para desenvolver adequadamente os movimentos, por controlar de forma efetiva a informação apropriada para determinada tarefa ou estímulo (MOGENSONI, SWANSON & WU, 1983; DeLONG, 1990; WICKENS, ARBUTHNOTT & SHINDOU, 2007).

No controle dos movimentos, os circuitos envolvendo os núcleos da base, especialmente os estriatais (putâmen e núcleo caudado), têm um papel singular. Isto, em função das aferências e eferências que recebe e direciona. Na verdade, os córtices frontal, parietal e temporal fazem aferências glutamatérgicas tanto ao putâmen quanto ao núcleo caudado. Estes, também recebem aferências da parte compacta da substância *nigra*, a qual tem ação gabaérgica. O núcleo caudado e o putâmen fazem aferências gabaérgicas ao globo pálido interno, à parte reticular da substância *nigra* e ao núcleo subtalâmico. Tanto o globo pálido interno quanto a substância *nigra* (parte reticular) têm ação inibitória sobre o tálamo. Este, por sua vez, exerce ação excitatória sobre os córtices. Ora, uma vez que o estriado esteja induzindo uma ação hiperpolarizante sobre o globo pálido interno e à parte reticulada da substância *nigra*, esta circuitaria acaba por conduzir a interrupção da ação inibitória destes sobre o tálamo, que, agora, passa a ficar livre da inibição tônica e desimpedido de excitar os córtices, de modo especial o pré-motor, e cooperar positivamente para a execução de movimentos (KIM et al., 1976; CRUTCHER & DeLONG, 1984; MINK & THACH, 1990; KAWAGUCHI, 1993).

Entretanto, para controlar o excesso de estímulo sobre o córtex motor, a circuitaria estriatal possui uma via de regulação chamada de indireta. Nesta, a parte compacta da substância *nigra*, através de estímulo sobre receptores D2

no núcleo caudado e putâmen proporcionam inibição destes, mesmo que recebam aferências excitatórias provenientes do córtex associativo. Estes, uma vez inibidos, exercerão ação gabaérgica sobre os segmentos interno e externo do globo pálido (Figura 2). A inibição do globo pálido externo acaba favorecendo a excitação do núcleo subtalâmico, que faz aferência ao globo pálido interno, o que dispara ação inibitória tônico-clônica sobre o tálamo que, por sua vez, interrompe sua transmissão ao córtex motor (DeLONG, 1990; KAMAGUCHI, 1993; AFIFI, 1994).



Esquema 2. Aferências e eferências dos núcleos da base.

Fonte: Purves & Augustine, *Neurociências*, Artmed, 2ªed.:PoA, 2001, com modificações.

Desta forma, é possível perceber que lesões sobre as áreas corticais, estriatais e relacionadas à aquisição e facilitação de memória conduzem a prejuízos sobre a circuitaria neurolocomotora, que serão mais ou menos

intensos, podendo gerar seqüelas debilitantes, dependendo da gravidade do neurotrauma sofrido.

2.7 Selênio e Compostos Orgânicos à Base de Selênio

2.7.1 Selênio

Muito embora o selênio (Se) tenha sido descoberto pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius em 1817 durante uma investigação toxicológica ocupacional, é atribuída ao Se uma participação histórica que remonta aos tempos das viagens de Marco Polo, onde, em seus relatos, descreve, ao passar por uma região da China, então conhecida como Succuir, que os cavalos eram, curiosamente, acometidos de perda de pêlos e dos cascos quando ingeriam certas plantas daquela região. Muito tempo depois, em 1928, a mesma manifestação foi observada por Kurt Franke em animais na região entre o sul do território de Dakota e Nebraska, nos Estados Unidos da América, que, ao estudar plantas consumidas por aqueles animais, atribuiu ao Se a toxicose apresentada.

O Se, por sua vez, pertence ao grupo 16 da tabela periódica, portanto um calcogênio, o qual pode apresentar-se sob quatro estados de oxidação, que são: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selênio elementar (Se^0) e seleneto (Se^{-2}). Estes estados permitem ao Se uma capacidade ampliada de reagir com outros elementos e moléculas.

Curiosamente, apesar de haver várias evidências da toxicidade do Se (em exposições prolongadas e ou ingestão de doses elevadas) em modelos experimentais e em pesquisas epidemiológicas, apontando-o como causa de alguns tipos de câncer, de neurotoxicidade, efeitos deletérios sobre a reprodução (anomalias congênitas), prejuízo na função hormonal (de modo particular à função tireoideana), hepatotoxicidade, imunossupressão, problemas dermatológicos, dentre outros (VINCENT et al., 2002), este organocalcogênio, desde 1957, é considerado como um elemento traço, sendo essencial à manutenção da homeostase corpórea (SCHWARTZ & FOLTSZ, 1957). E, se em doses elevadas propicia o aparecimento de toxicoses, a deficiência de Se induz à formação de certos tipos de cânceres, distúrbios cardiovasculares, doenças metabólicas - como o diabetes, hepatopatia e esclerose (GE et al., 1983; NAVARRO-ALARCÓN & LÓPEZ-MARTINEZ, 2000). Portanto, é um micronutriente que exige equilíbrio dietético para manutenção das atividades biológicas, com uma recomendação de ingestão diária para humanos de 50 a 200µg (REILLY, 1996; DUMONT et al., 2006).

As ações tóxicas ou salutaras do Se são atribuídas, em grande parte, às suas características físico-químicas semelhantes ao enxofre (S), o qual faz parte da composição de várias enzimas e proteínas. Esta condição revela a possibilidade de interação entre Se e S, bem como da substituição de S por Se em biomoléculas - principalmente sob a forma de selenocisteína, o que esclarece, pelo menos em parte, sua interferência na fisiologia de vários tecidos (STADTMAN, 1980).

E, em função das características acima apontadas, já foi possível ser demonstrada a interferência na função de algumas enzimas importantes do

organismo por compostos orgânicos à base de Se, tais como a 5-Lipoxigenase (BJÖRNSTEDT et al., 1996), a Esqualeno monooxigenase (GUPTA & PORTER, 2001) a δ -Aminolevulinato desidratase (NOGUEIRA et al., 2003) e a Na^+/K^+ ATPase (BORGES et al., 2005).

Sendo assim, compostos organo-selenados são uma emergente classe de compostos que tem sua importância fundamentada sob os interesses da toxicologia e da farmacologia, dentre outras áreas do conhecimento que interagem de uma forma ou de outra com a vida.

2.7.2 Ebselen

Dentre os principais compostos orgânicos à base de selênio, sem dúvida alguma, o ebselen (Figura 2) é um dos destaques. Isto pelo fato de ter sido demonstrado que este composto possui uma considerável versatilidade de efeitos sobre vários tecidos através de numerosos estudos, os quais tiveram início há mais de duas décadas e que perduram até os dias atuais (MULLER et al., 1984; BRIVIBA et al., 1996; JOZSEF & FILEP, 2003; KIM et al., 2008).

Quimicamente o ebselen (2-fenil-1,2-benzilsoselenazol-3(2H)-ona) pertence a uma classe de compostos denominados de organocalcogênicos, os quais se fazem presentes com frequência na rotina dos químicos orgânicos, uma vez que são intermediários de várias reações de síntese orgânica (PALMIER, 1984; BRAGA et al., 1997; ZENI et al., 2001).

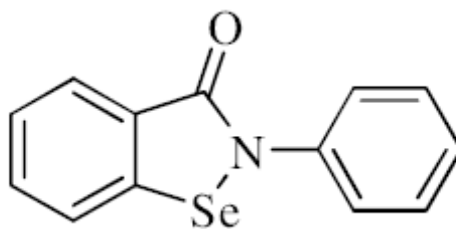


Figura 2. Estrutura química do ebselen.

Todavia, os compostos organocalcogênicos e, com notoriedade o ebselen, ganharam maior prospecção a partir da década de 1990, já que passaram a ser descobertas propriedades de interesse biológico e farmacológico desta classe de composto. De fato, são atribuídas ao ebselen propriedades como antioxidante, anti-aterosclerótica, antiinflamatória e citoprotetora tanto em ensaios *in vitro* quanto *in vivo* (CHRISTISON, SIES & STOCKER 1994; DAWSON et al., 1995; TAKASAGO et al., 1997; IMAI et al., 2001; NAKAMURA et al., 2002; PORCIUNCULA et al., 2003; BRODSKY & GEALEKMAN, 2004; NOGUEIRA, ZENI & ROCHA, 2004; SHEWE, 2005; MORETTO et al., 2005).

Dentre as propriedades já descobertas do ebselen, talvez uma das mais notáveis seja a antioxidante. Esta propriedade inicialmente foi atribuída à sua capacidade de mimetizar a ação da glutathione peroxidase. Contudo, além desta ação, o ebselen utiliza de forma bem mais pronunciada o sistema tireodoxina/tireodoxina redutase que o sistema glutathione peroxidase para exercer sua ação antioxidante (ZHAO & HOLMGREN, 2002).

Ainda dentro deste contexto, os estudos com o ebselen demonstraram que este composto é capaz de diminuir o estresse oxidativo provocado por isquemia e reperfusão cardíaca (HOSHIDA et al., 1997), além de melhorar os

déficits neurológicos provocados por aneurisma cerebral hemorrágico e infarto agudo isquêmico (SAITO et al., 1998; YAMAGUCHI et al., 1998; OGAWA et al., 1999).

Outra propriedade interessante do ebselen é que, diferentemente de outros compostos organo-selenados, possui baixa toxicidade, a qual é atribuída à sua estabilidade molecular e à sua não interferência no metabolismo relacionado ao selênio, uma vez que, durante sua biotransformação, não ocorre liberação de selênio livre para o organismo (ZHAO & HOLMGREN, 2002).

De qualquer forma, o conjunto dessas propriedades supracitadas aponta o ebselen como um composto interessante e promissor, tornando-o passível de continuar sendo objeto de investigações biológicas e clínicas.

2.7.3 Disseleneto de Difenila

Outro composto organo-selenado que tem sido bastante estudado é o disseleneto de difenila (PhSe)₂. Este organocalcogênio apresenta algumas propriedades semelhantes ao ebselen, como a atividade mimética da glutathione peroxidase, a qual está presente devido sua atividade tiol peroxidase (ROSSATO et al., 2002; MEOTTI et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2003). E, em virtude da presença de selênio em sua estrutura química, traz intrinsecamente, um bom potencial para sua aplicação clínico-biológica, uma vez que o seleneto é capaz de interagir com uma série de moléculas, tais como glutathione, cisteína, ácido dihidrolipóico e coenzima A (NOGUEIRA, ZENI & ROCHA, 2004)

Vários efeitos interessantes têm sido atribuídos ao $(\text{PhSe})_2$ (Figura 3), tais como: efeito redutor da atividade glutamatérgica, neuroprotetor hipocampal em ratos submetidos à hipóxia e hipoglicemia, antioxidante protetor contra a lipoperoxidação, efeitos antiinflamatório e antinociceptivo, bem como seu efeito facilitador da aquisição de memória (ROSSATO et al., 2002; GHISLENI, et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2003^a; NOGUEIRA et al., 2003^b; MEOTTI et al., 2004; ZASSO et al., 2005; BORGES et al., 2005). Estes efeitos demonstrados em ensaios experimentais dão chancela a um possível efeito neuroprotetor do $(\text{PhSe})_2$ dada a diversidade de alvos moleculares possíveis, e em diferentes rotas bioquímicas.

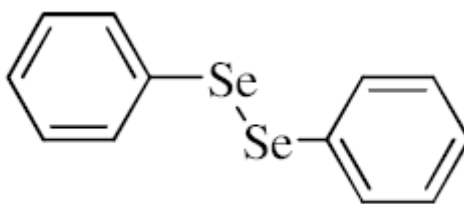


Figura 3. Estrutura química do disseleneto de difenila $(\text{PhSe})_2$.

Quanto ao aspecto toxicológico, é bem estabelecido que a toxicidade *in vivo* de compostos orgânicos à base de selênio está relacionada com a estabilidade de ligação entre o carbono e selênio da molécula, de forma que ligações com selênio em que o carbono envolvido apresente um estado sp^3 são mais lábeis que as que apresentam um estado sp^2 . Dessa forma, compostos organo-selenados aromáticos são potencialmente menos tóxicos que seus correspondentes alifáticos (PHARNHAM & GRAF, 1991).

Dentro deste contexto, o $(\text{PhSe})_2$ parece apresentar menos toxicidade que o ebselen na maioria dos experimentos realizados, considerando-se

espécies de animais, vias de administração e doses utilizados (NOGUEIRA, ZENI & ROCHA, 2004).

Outro aspecto interessante de ser lembrado é a timidez quantitativa de trabalhos que descrevam a farmacocinética e a toxicocinética de Se (WANGER et al., 1976) e compostos organo-selenados, como o $(\text{PhSe})_2$. Mas, apesar de haverem poucos estudos nestas áreas, já foi possível se contatar que ocorre um aumento da concentração cerebral dos níveis de selênio após administração crônica de $(\text{PhSe})_2$, utilizando a via subcutânea, com uma dose considerada elevada para o composto ($250 \mu\text{mol/Kg}$) o que torna evidente que o $(\text{PhSe})_2$ é capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e agir sobre o SNC (NOGUEIRA, ZENI & ROCHA, 2004). Adicionalmente a esta evidência, outros ensaios experimentais sugerem que o efeito neurotóxico ou neuroprotetor do $(\text{PhSe})_2$ é dependente da concentração e de seu volume de distribuição no tecido cerebral e, logicamente, dos fatores que podem interferir com parâmetros farmacológico ou toxicocinéticos deste organocalcogênio (NOGUEIRA et al., 2001; JACQUES-SILVA et al., 2001; MACIEL et al., 2003).

Sendo assim, de forma semelhante ao seu congênere, o ebselen, o $(\text{PhSe})_2$ é uma molécula potencialmente promissora quanto à perspectiva clínica, uma vez que faz frente a várias possibilidades terapêuticas. E, de modo particular neste trabalho, será apresentado seu efeito neuroprotetor em relação a prejuízos neurológicos e neurolocomotor após trauma mecânico encefálico.

3. MANUSCRITOS

3.1 Manuscrito I

**Trauma Brain Injury Decreases $^{45}\text{Ca}^{+2}$ Influx in Slices from Cortex, Hippocampus
and Striatum: Protective effect of Diphenyl Diselenide**

Oliveira, LFS; Puntel, RL; Fachinetto, R; Villarinho, JG; Rocha, JBT;

Alves, D; Zeni, G; Nogueira, CW.

*Departamento de Química, CCNE, Universidade Federal de Santa Maria, Santa
Maria/RS, Brazil, Toxicological Biochemistry Post-Graduate Programme.*

ABSTRACT

Traumatic brain injury (TBI) is one of major forms of acute brain injury that could be lead to significant neuronal impairment. Diphenyl diselenide (PhSe_2) is an organic selenium compound that display antioxidant and neuroprotective properties. The aim of the present study was to evaluate the effects of the oral administration of (PhSe_2) on Trauma Brain Injury (TBI) rat model, using as parameters $^{45}\text{Ca}^{+2}$ influx in cortex, striatum and hippocampus slices; and serum magnesium concentration. There was possible to verify at dose administered an increase in $^{45}\text{Ca}^{+2}$ uptake by cerebral cortex, striatum and hippocampus slices in animals groups that suffered TBI and received (PhSe_2) treatment (100 mM 15 minutes post TBI event), especially at the pre-treatment group (20mM by 3 days and 100 mM 15 minutes post TBI event) when compared with TBI group. We still verified that (PhSe_2) treatment and pre-treatment showed increase in serum magnesium concentration. Therefore, considering the relevance of studies on the development of new drugs that can decrease neuronal death and improve the patients recover post TBI, ours results suggest that (PhSe_2) could be investigated as pharmacological tools against TBI.

Keywords: selenium, calcium uptake, magnesium, and trauma brain injury.

1. Introduction

Cerebral concussion and traumatic brain injury (TBI) are a disturbance of neural function frequently induced by a sudden acceleration and deceleration forces of the head usually without skull fracture [1;2]. Falls, collisions, road traffic accidents and contact sports are among the mains causes of cerebral damage [2;3]. A large number of studies have been shown that the TBI is associated with various primary events like glutamate release, elevated intracellular calcium, free fatty acid generation, the formation of free radicals and subsequent lipid peroxidation [4;5] as well as the decrease of serum magnesium contents [6]. Such primary events may cause secondary damage by activating endogenous autodestructive biochemical processes. However, the exact primary biochemical changes following trauma that causes secondary tissue injury that may lead to cell death are still completely unknown [3].

Ca^{2+} is an important intracellular messenger regulating a variety of cellular functions, such as membrane excitability, exocytosis, and synaptic neurotransmitter release. Neural cells possess specialized homeostatic mechanisms to ensure a fine regulation of free cytosolic Ca^{2+} levels. In their resting state, free calcium levels are maintained at low levels (100 nM). Cells control free intracellular Ca^{2+} levels using different mechanisms that involve Ca^{2+} influx and efflux through channels or pumps. Physiologically, precisely regulated Ca^{2+} movements control multiple signaling cascades within the same cell. However, sustained elevation in cytosolic free Ca^{2+} may activate autodestructive mechanisms, including activation of proteases, lipases, endonucleases and overproduction of reactive oxygen species that eventually lead to cell death [3;7-10].

On the other hand, the encephalic magnesium levels play a crucial role in cerebral metabolic homeostasis. Indeed have been awarded to magnesium a several of encephalic effects and the decline in magnesium concentration affects a number of

secondary injury factors including neurotransmitter release as glutamate, decrease in NMDA receptor activity and calcium channels, decrease of oxidative stress, protein synthesis and energy metabolism. Thus it is possible to accept that the cerebral magnesium and calcium levels are altered in TBI [6;11-15]

Organoselenium compounds have been reported to possess chemical and biological anti-oxidant properties [16-19]. Of particular importance, the organoselenium compound ebselen (2-phenyl-1,2-benzisoselenazole-3[2]-one), a lipid-soluble seleno-organic compound that is a potent anti-oxidant agent, has shown to be neuroprotective in pre-clinical studies and in a variety of *in vitro* and *in vivo* animal models of neuropathological conditions, including ischemia, quinolinic acid or glutamate-induced lipoperoxidation [20;21], alterations on glutamatergic homeostasis at the pre-synaptic level [22], and anti-toxicity effects post exposure to methylmercury [23]. Similarly to ebselen, diphenyl diselenide, a simple organochalcogenide have been showed interesting properties like anti-oxidant [24;25], suitability in produce antinociception in several models of pain through mechanisms that involve an interaction with not only nitrergic system but also via interaction with redox modulatory sites of glutamate receptors [26], antiulcer activity via inhibition of gastric K⁺-ATPase activity [27] and protection against cadmium-induced liver damage [28]. Furthermore diphenyl diselenide have been demonstrated possess some effects on Central Nervous System (CNS), more specifically on memory, depression, seizures, dyskinesia and anxiety [29-31]. Nevertheless, diphenyl diselenide have been showed to alter the bioenergetic metabolism in rat models [32;33].

The purpose of this study was to investigate the effect of diphenyl diselenide against a TBI model via membrane ⁴⁵Ca⁺² uptake and serum magnesium levels post TBI induction in rats.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Diphenyl diselenide was synthesized according to literature methods [34]. Analysis of the ^1H MNR and ^{13}C MNR spectra showed that the compound obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with their assigned structures. The chemical purity of diphenyl diselenide (99%) was determined by GC/HPLC. $^{43}\text{Ca}^{+2}$ were obtained from Sigma® and the reactant to magnesium measurement was obtained from Bioclin Kit Laboratory®. All other chemicals were obtained from commercial suppliers.

2.2 Animals

Seventy-day-old, Wistar rats were used in the experiments. They were maintained at approximately 22°C, on a 12:12h light/dark cycle with free access of food and water until the end of experiments.

2.3 Traumatic Brain Injury (TBI)

TBI carried out essentially as described by Phol et al. (1998) [4], with some modifications. The animals were anesthetized via intraperitoneal with 0.2 mL of ketamine plus xylazine (both 100 mg/100 g of rat weight) and placed immobilized on a stretcher until the end of the procedure. A skin incision was made to expose the skull surface to do a 0.5 cm hole. The injury device consisted of a hollow stainless steel tube 40 cm long. The device was kept perpendicular to the surface of the hole and guided a falling weight onto a circular footplate (2.0 mm in diameter) resting upon the surface of the dura mater. A force of 320 g·cm produced by a 20 g weight was selected to procedure brain injury. The coordinates in relation to lambda to make the hole were 4

mm anterior and 3 mm lateral. All the animals were subjected to brain injury except those belong to group I that only subjected to incision, anesthetic and prophylactic penicillin administration I.M. – Sham group. All groups received 21.500 UI of penicillin as antibiotic prophylaxis caution 72 hour before to TBI procedures. The experiments were performed in accordance with the local Animal Care Committee.

2.4 The treatments

The animals were divided in four groups: the Sham group, described above, the TBI group, the pre-treatment group and treatment group. The last three groups were subject to anesthetic, prophylactic penicillin administration I.M. and brain injury. The pre-treatment group (PT) received by 4 days before brain injury diphenyl diselenide at dose 20 mM V.O. and after 15 minutes lesion ending performed. The treatment group (T) received 100 mM V.O. after 15 minutes lesion performed. At 2 hours after TBI the animals were killed by decapitation and the cortex, striatum and hippocampus were quickly dissected at and transverse sections (400 μ m) were rapidly prepared using a tissue chopper (MTC/2E model). Serum samples were collected too.

2.5 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake carried out essentially as described by Rosa et al. (2004) [35], with some modifications. Briefly, two salt solutions were used in this experiment: Krebs buffer and lanthanum solution. The slices were pre-incubated in polycarbonate plates for 22 min. at 32°C. 0.68 μCi $^{45}\text{Ca}^{2+}$ was added to the incubation and the uptake was carried out for 8 min at 32°C. After, the reaction was stopped by two washes with 1 mL lanthanum solution. Just after washing, 0,3 mL of 0.5 M NaOH was added to the wells and slices were digested overnight. Aliquots of lysates were taken for protein content

measurement by Lowry et al. (1951) [36] method, using bovine serum albumin as standard. Liquid scintillation counting (Packard Tri-carb 2100 TR model) was performed to determine the intracellular amount of calcium. Nonspecific calcium uptake was determined by carrying out using the same experiment. However in the lanthanum solution was added nonspecific voltage-dependent calcium blocker lanthanum. Results were expressed as $\text{pM}^{45}\text{Ca}^{2+}/\text{g}$ protein. Specific uptake was considered as the difference between total uptake and nonspecific uptake.

2.6 Magnesium measurement

Magnesium carried out by Bioclin Kit Laboratory®. Briefly, Mann e Yoe pigment, in alkaline pH and the magnesium presence develop red coloration. The intensity of complex red color is proportional to the free magnesium concentration. The method doesn't require deproteinization neither suffer interference of calcium gluconate. The tubes used in this experiment were previously treated with nitric acid 1 N overnight and after washed with deionised water. The spectrophotometer apparatus utilized was Biochron Libra 522.

2.7 Statistical analysis

$^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake experiment was carried out at least in triplicate. Statistical significance was assessed by Kruskal-Wallis. A value of $P < 0,001$ was considered to be significant. Data was expressed as mean \pm S.E.M. Magnesium experiment was carried out in duplicate and statistical significance was assessed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's multiple range test. A value of $P < 0.05$ was considered to be significant. Data was expressed as mean \pm S.E.M.

3. Results

Cellular specific calcium uptake capacity in the presence or absence of nonspecific voltage-dependent calcium blocker lanthanum was evaluated by measurement of $^{45}\text{Ca}^{+2}$ uptake in cortex, striatum and hippocampus cells of rats that were submitted or not at TBI and or $(\text{PhSe})_2$ treatments. At all structures analyzed was possible to observe analogous behavior after TBI and $(\text{PhSe})_2$ treatments performed at the dose and via used. The data obtained from TBI group showed its incapacity to perform specific calcium uptake as much in cortex as striatum and hippocampus (Figures 1, 2, and 3). The Treatment group (100 mM/15 min.) showed intermediary outcomes at the dose utilized in all structures analyzed. These data shows that it was unable to perform a suitable specific calcium uptake after subjected to trauma but there was a tendency to recover it (Figure 1, 2 and 3). However the Pretreatment group (20 mM/ 3 days plus 100 mM post TBI) at the dose utilized showed efficient to counteract similar specific calcium uptake levels presented by Sham group (Figure 1 and 3), especially at the striatum (Figure 2).

We also investigate the involvement of magnesium in TBI model performed (Figure 4). Free magnesium colorimetric analysis showed that TBI decreased serum magnesium levels whereas Pre-treatment was able to prevent this decrease similarly to magnesium Sham group levels. Treatment group at the dose utilized was not able to prevent decrease of serum magnesium levels; however there was the tendency to recover the levels.

Calcium uptake - Cortex

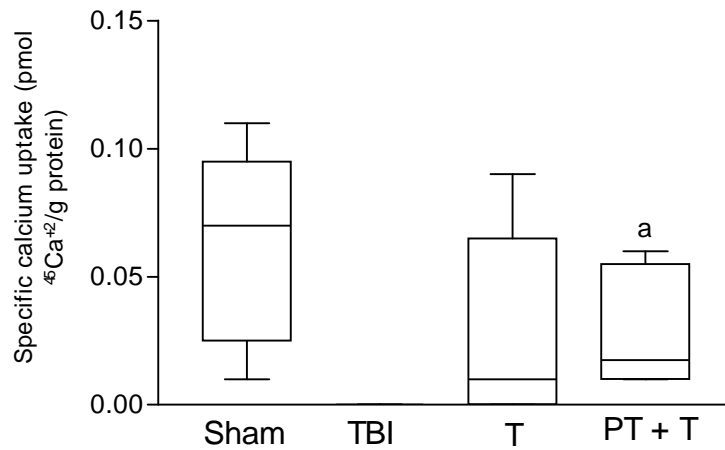


Figure 1. Effect of $(\text{PhSe})_2$ on specific $^{45}\text{Ca}^{+2}$ uptake into rat cerebral cortex slices. Rat cerebral cortex was incubated with $0.7 \mu\text{M } ^{45}\text{Ca}^{+2}$ ($0.68 \mu\text{Ci}$). Data are mean, quartis (25%-75%), and standart deviation (Min-Max) from four independent experiments. (a) Significantly different from TBI group, $P < 0.001$ (Kruskall-Wallis test).

Sham – positive control; TBI - trauma brain injury; T – treatment; PT – pretreatment plus treatment.

Calcium uptake - Striatum

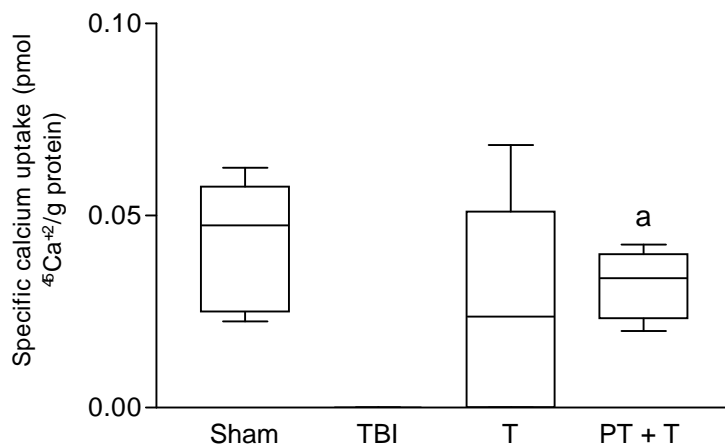


Figure 2. Effect of $(\text{PhSe})_2$ on specific $^{45}\text{Ca}^{+2}$ uptake into rat cerebral striatum slices. Rat cerebral striatum was incubated with $0.7 \mu\text{M}$ $^{45}\text{Ca}^{+2}$ ($0.68 \mu\text{Ci}$). Data are mean, quartis (25%-75%), and standart deviation (Min-Max) from four independent experiments. (a) Significantly different from TBI group, $P < 0.001$ (Kruskall-Wallis test).

Sham – positive control; TBI - trauma brain injury; T – treatment; PT – pretreatment plus treatment.

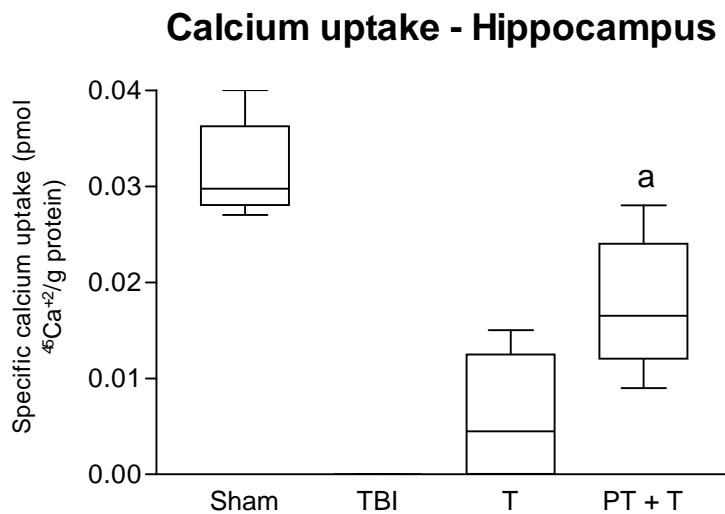


Figure 3. Effect of $(\text{PhSe})_2$ on specific $^{45}\text{Ca}^{+2}$ uptake into rat cerebral hippocampus slices. Rat cerebral hippocampus was incubated with $0.7 \mu\text{M}$ $^{45}\text{Ca}^{+2}$ ($0.68 \mu\text{Ci}$). Data are mean, quartis (25%-75%), and standart deviation (Min-Max) from four independent experiments. (a) Significantly different from TBI group, $P < 0.001$ (Kruskall-Wallis test).

Sham – positive control; TBI - trauma brain injury; T – treatment; PT – pretreatment plus treatment.

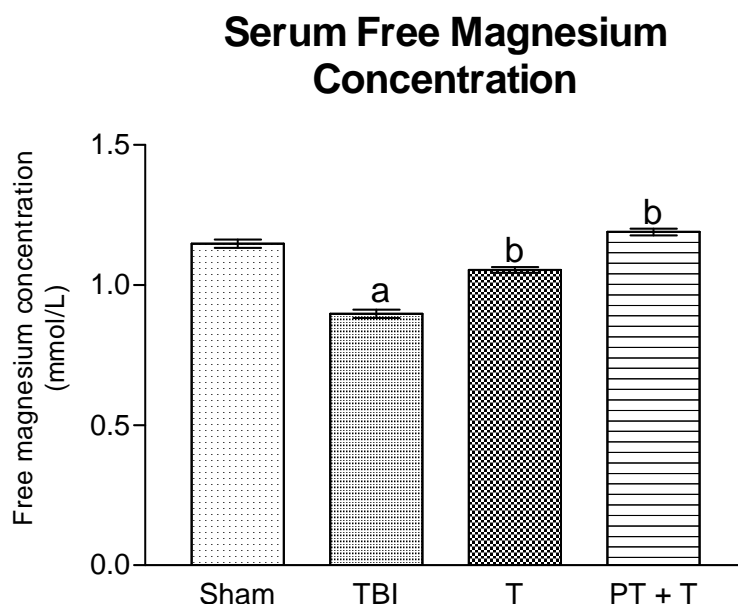


Figure 4. Effect of $(\text{PhSe})_2$ on serum magnesium concentration at different treatment post TBI. Data was expressed as mean \pm S.E.M. *a Significantly different from Sham group; *b significantly different from TBI group; both with $p < 0,05$ (ANOVA followed by Duncan's multiple range test).

Sham – positive control; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment

4. Discussion

It has been well accepted that intracellular calcium signaling plays a major role in physiological as well as pathological functions [26]. The source of the increase in intracellular calcium may be derived from release from intracellular calcium stores as endoplasmic reticulum and mitochondria via store-operated Ca^{+2} channels activated or extracellular calcium entry via voltage-operated Ca^{+2} channels or receptor-operated Ca^{+2} channels [27]. However, whether transient increases of intracellular calcium concentration are important to cellular signal transduction, elevations for long time of intracellular calcium could be lethal due to mitochondrial membrane dysfunction and cell death induced in part by calcium-mediated excitotoxicity [29, 30, 31] and or failure to regulate cell volume [32]. Consequently, apoptosis or necrosis mechanisms could be deflagrated [33]. Furthermore there are several substances and mechanisms evolved as much physiological as pathological events in brain cells. So it is reasonable to suggest that there are various targets to try assessment against cellular processes unchained by TBI. In this context, our data suggest that $(\text{PhSe})_2$ at the dose and via administered showed to possess some effect against TBI model utilized. Although we may not precisely the mechanism, $(\text{PhSe})_2$ showed able to ameliorate the specific calcium uptake in TBI.

In this study it was possible to observe that when the tissue previously subjected to TBI, the cells seem to lose their regulatory properties linked to ion-voltage dependent

transport modulation, that lead to decrease in calcium uptake. However, when the rats received (PhSe)₂ there was a specific calcium uptake ameliorate, especially in pretreatment group when compared with TBI group. In fact, the outcomes of pretreatment group almost reached of the sham group. In addition, these finding lead to suggest witch (PhSe)₂ had successes to avoid impairment of plasmatic membrane integrity and the activity of yours receptors at least in part. In line with this, perhaps there is a relationship among the plasmatic membrane integrity maintenance with some (PhSe)₂ properties already referred as decrease of stress oxidative levels [22], what could be leading to decrease the intracellular calcium influx induced by TBI, and consequently a minus cellular damage.

Another important ion involved in physiology and pathology process is the magnesium. Indeed, some authors have been suggested that magnesium could be a role in apoptosis modulation by controlling the nuclear membrane proteins in brain [14;15]. In addition magnesium affects the cellular physiology, including potassium and calcium transports, modulation signal transduction, energy metabolism, and cell proliferation [37-40]. Several experiments have been showing a decrease in brain intracellular free magnesium concentration post TBI in human [41, 42, 43] and in experimental TBI rat models [44]. Furthermore, Burton et al. (2003) mentioned witch in some studies with laboratory animals subjected to magnesium treatment showed a reduction in brain cortical damage and posttraumatic edema, in combination with concomitant changes in gene expression for c-fos, neurotrophins, cyclooxygenase-2, and heat shock protein-70.

In this study, serum magnesium concentration in pretreatment group was counteracted suggesting which there was a modulation in magnesium levels by (PhSe)₂ that was able to aid to prevent a major damage post trauma in nervous cells, probably because magnesium ion has directly correlation with N-Methyl-D-aspartate and calcium channel transport modulation and plasmatic membrane stability. The

opposed was observed in TBI group when calcium uptake and serum magnesium was found diminished (VINK et al., 2003).

In conclusion, the (PhSe)₂ pretreatment ameliorate the specific calcium uptake in cortex, striatum and hippocampus and serum magnesium levels of rats subjected to TBI. These results could be associated with the integrity plasmatic membrane, ions transport and cellular metabolism viability which suggest that (PhSe)₂ have a pharmacological therapeutic potential against TBI. Nevertheless it is necessary to do complementary studies.

Acknowledgements

The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged.

References

1. Shaw, N.A. The neurophysiology of concussion. *Progr. Neurobiol.*, v.67, p.281-344, 2002.
2. Gaetz, M. The neurophysiology of brain injury. *Clin. Neurophysiol.*, v.115, p.4-8, 2004.
3. J.F.Kraus, J.F. & Nourjah, P. The epidemiology of mind, uncomplicated brain injury. *J. Trauma*, v. 28, p.1637-1643, 1998.
4. Pohl, D.; Bittgau, P.; Ishimaru, M.J.; Stadthaus, D.; Hübner, C.; Olney, J.W.; Turski, L.; Ikonomidou, C. N-Methyl-D-Aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Pharmacology*, v.96, p.2508-2513, 1999.
5. Rosa, R.B.; Shwarzbold, C.; Dalcin, K.B.; Ghisleni, G.C.; Ribeiro, C.A.J.; Moretto, M.M>; Frizzo, M.E.S.; Hoffmann, G.F.; Souza, D.O.; Wagner, M. Evidence that 3-hydroxyglutaric acid interacts with NMDA receptors in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of young rats. *Neurochem. Interac.*, v.45, p.1087-1094. 2004.

6. Health, D.L. & Vink, R. Traumatic brain axonal injury produces sustained decline in intracellular free magnesium concentration. *Brain Res.*, v.738, p.150-153, 1996.
7. Florea, A.M.; Splettstoesser, F.; Dopp, E.; Rettenmeir, A.W.; Büsselber, D. Modulation of intracellular calcium homeostasis by trimethyltin chloride in human tumour cells: Neuroblastoma SY5Y and cervix adenocarcinoma HeLa S. *Toxicology*, v.216, p.1-8, 2005.
8. Berridge, M.J. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature*, v.361, p.315-325, 1993.
9. Berridge, M.J. & Bootman, M.D.. Calcium - a life and death signal. *Nature*, v. 395(6703), p.645-648, 1998.
10. Berridge, M.J.; Lipp, P.; .Bootman, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 280(3), p.195-203, 2000.
11. Vink, R.; O'Connor, C.A.; Nimmo, A.J. Health, D.L.; Magnesium attenuates persistent functional deficits following diffuse traumatic brain injury in rats. *Neurosci. Lett.*, v. 336, p.41-44, 2003.
12. Cenark, I.; Savic, V.J.; Kotur, j.; Prokic, V.; Veljovic, M.; Grbovic, D. Characterization of plasma magnesium concentration and oxidative stress following graded traumatic brain injury in humans. *J. Neurotrauma*, v.17, p.53-68, 2000.
13. Health, D.L. & Vink, R. Blood free magnesium concentration declines following graded experimental traumatic brain injury. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v.58, p.161-166, 1998.
14. Health D.L. & Vink, R. Brain intracellular free magnesium declines after impact-acceleration induced brain injury in rats. *Neurosci. Res. Comm.*, v.18(3), p.163-168, 1996.
15. Saatman K.E.; Bareyre, F.M.; Grady M.S.; McIntosh, T.K. Acute cytoskeleton alterations and cell death induced by experimental brain injury are attenuated by magnesium treatment and exacerbated by magnesium deficiency. *J. Neutopath. Exp. Neurol.*, v. 60(2), p.183-194, 2001.
16. Mugesh, G.; duMont, W.W. & Sies, H. Chemistry of Biologically Important Organoselenium Compound. *Chem. Rev.*, v.101, p.2125-2179, 2001.
17. Iman, S.I.; Newport, G.D.; Islan, F.; Slikker Jr., W.; Ali, S.A. Selenium, an antioxidant, protects against methamphetamine-induced dopaminergic neurotoxicity. *Brain Res.*, v.818, p.575-578, 1999.
18. Davis, M.T. & Bartfay, W.J. Ebselen decreases oxygen free radical production and iron concentrations in the heart of chronically iron-overloaded mice. *Biol. Res. Nursing*, v.6(1), p.37-45, 2004.

19. Meotti, F.C.; Stangherlin, E.C.; Zeni, G.; Nogueira, C.W.; Rocha, J.B.T. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Envir. Res.*, v.94, p.276-282, 2004.
20. Porciúncula, L.O.; Rocha, J.B.T.; Cimarosti, H.; Viandé, L.; Ghisleni, G.C.; Salvego, C.G.; Souza, D.O. Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-deprivation: correlation with immuncontent of inducible nitric oxide syntase. *Neurosci. Lett.*, v.346, p.101-104, 2003.
21. Ineu, R.P.; Pereira, M.E.; Aschner, M.; Nogueira, C.W.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. *Food Chem. Toxicol.*, v.46(9), p.3023-3029, 2008.
22. Nogueira, C.W.; Rotta, L.N.; Perry, M.L.; Souza, D.O.; Rocha, J.B.T. Diphenyl diselenide and diphenyl ditellyride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. *Brain Res.*, v.906, p.157-163, 2001.
23. Farina, M.; Frizzo, M.E.S.; Soares, F.A.; Schwalm, F.D.; Dietrich, M.O.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T.; Souza, D.O. Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. *Toxicol. Lett.*, v.144, p.351-357, 2003.
24. Luchese C.; Sthangerlin, E.C.; Ardais, A.P.; Nogueira, C.W.; Santos, F.W. Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. *Toxicology*, v.230, p.189-196, 2007.
25. Barbosa, N.B.V.; Rocha, J.B.T.; Soares, J.C.M.; Wondracek, D.C.; Gonçalves, J.F.; Schetinger, M.R.C.; Nogueira, C.W. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.*, v.46(1), p.186-194, 2008.
26. Savegnago, L.; Pinto, L.G.; Jesse, C.R.; Alves, D.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.*, v.555, p.129-138, 2007.
27. Savegnago, L.; Trevisan, M.; Alves, D.; Rocha, J. B. T.; Nogueira, C. W.; Zeni, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environm. Toxicol. Pharmacol.*, v.21, p.86-92, 2006.
28. Luchese C.; Brandão, R.; Oliveira, R.; Nogueira, C.W.; Santos, F.W. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol. Lett.*, v. 173, p.181-190, 2007.
29. Savegnago, L.; Jesse, C.R.; Pinto, L.G.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. *Progr. Neuro-Psychopharm. Biol. Psychiatry.*, v.31, p.1261-1269, 2007.
30. Burger, M.E.; Fachinetto, R.; Wagner, C.; Perottoni, J.; Pereira, R.P.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T. Effects of diphenyl-diselenide on orofacial dyskinesia model in rats. *Brain Res. Bull.*, v.70, p.165-170, 2006.

31. Rosa, R.M.; Flores, D.G.; Appelt, H.R.; Braga, A.L.; Henriques, J.A.P.; Roesler, R. Facilitation of long-term object recognition memory by pretaining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci. Lett.*, v.341, p.217-220, 2003.
32. Barbosa, N.B.V.; Rocha, J.B.T.; Wondracek, D.C.; Perottoni, J.; Zeni, G.; Nogueira, C.W. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. *Chemico-Biol. Interact.*, v.163, p.230-238, 2006.
33. Ghisleni, G.C.; Porciúncula, G.C.; Cimarosti, H.; Rocha, J.B.T.; Salbego, C.G.; Souza, D.O. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoreactivity. *Brain Res.*, v.986, p.196-199, 2003.
34. Paulmier, C. Selenoorganic functional groups - Selenium reagents and intermediate in organic synthesis. *Pergamon Press*. 1st ed., Oxford: England, p.25-51, 1986.
35. Rosa, R.B.; Shwarzbold, C.; Dalcin, K.B.; Ghisleni, G.C.; Ribeiro, C.A.J.; Moretto, M.B.; Fizzo, M.E.S.; Hoffmann, G.F.; Souza, D.O.; Wagner, M. Evidence that 3-hydroxyglutaric acid interacts with NMDA receptors in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of young rats. *Neurochem. Int.*, v.45, p.1087-1094, 2004.
36. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.R.; Farr, A.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.
37. Kahramana, S. Monitoring of serum ionized magnesium in neurosurgical intensive care unit: preliminary results. *Clin. Chim. Acta*, v.334, p.211-215, 2003.
38. McIntosh, T.K. Magnesium protects against neurological deficit after brain injury. *Brain Res.*, v.482, p.252-260, 1989.
39. Menon, Z.I. Predictive value of serum ionized but not total magnesium concentration in head injuries. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v.55, p.671-677, 1995.
40. Polderman, K.H. Hypomagnesaemia and hypophosphataemia at admission in patient with severe head injury. *Crit. Curr. Med.*, v. 28, p.2022-2025, 2000.
41. Kahraman, S.; Ozgurtas, T.; Kayali, H.; Atabey, C.; Kutluay, T.; Timurkaynak, E. Monitoring of serum ionized magnesium in neurosurgical intensive care unit: preliminary results. *Clin. Chim. Acta*, v.334, p.211-215, 2003.
42. Health, D. L.; Vink, R. Traumatic brain axonal injury produces sustained decline in intracellular free magnesium concentration. *Brain Res.*, v.738, p.150-153, 1996.
43. Health, D. L.; Vink, R. Blood free magnesium concentration declines following graded experimental traumatic brain injury. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v. 58, p. 161-166, 1998.

44. Vink, R.; O'Connor, C. A.; Nimmo, A. J.; Heath, D. L. Magnesium attenuate persistent functional deficits following diffuse traumatic brain injury in rats. *Neurosci. Lett.*, v.336, p.41-44, 2003.

3.2 Manuscrito II

Fear conditioned and spontaneous alternation behaviors in rats subjected to trauma brain injury (TBI): Diphenyl Diselenide attenuated deficits on acquisition and facilitation memory

Oliveira, LFS; Puntel, RL; Rocha, JBT; Nogueira, CW.

Departamento de Química, CCNE, Universidade Federal de Santa Maria,

Santa Maria/RS, Brazil, Toxicological Biochemistry Post-Graduate Programme.

ABSTRACT

Diphenyl diselenide, (PhSe)₂, is an organoselenium compound that affects a number of neuronal processes. The effect of this compound on memory acquisition and long-term memory facilitation was evaluated in Wistar rats subjected to TBI. The facilitation of memory process was recorded at pre-training period, and the acquisition of memory was assessed in only one period. The behavioral changes in the fear conditioned and

spontaneous alternation tasks, as well as startle test were performed in 24 hours after TBI. The $(\text{PhSe})_2$ was able to increase the acquisition and facilitation of memory activity in both tasks, shown a neuroprotection effect about this, especially when the $(\text{PhSe})_2$ was administered before and after to TBI. The startle test was assessed to give security to analyze from fear-conditioned task. The both $(\text{PhSe})_2$ treatments was able to ameliorate the acquisition and facilitation of memory, with distinction to pretreatment. We concluded that pretreatment and treatment with $(\text{PhSe})_2$ can ameliorate the damages induced by TBI in Wistar rats at dose and via utilized on acquisition of memory and in long-term memory facilitation.

Key-words: selenium, TBI, neuroprotection, memory acquisition, and long-term memory facilitation.

1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is one of major forms of acute brain injury that could lead to significant neuronal cell death, which has clinical manifestation as losses in neurological functions, especially in humans under the age of 50 (SHAW, 2002; LIOU et al., 2003). This neural disturbance is frequently induced by a sudden acceleration and deceleration forces of the head usually without skull fracture (GAETZ, 2004). Falls, collisions, road traffic accidents and contact sports are among the mains causes of this cerebral damage (KRAUS and NOURJAH, 1998; GAETZ, 2004). In line with this, victims of TBI suffer short and long-term physical, cognitive, behavioral and emotional impairments that depend on the severity of the injury (ZOHAR et al., 2003). Interesting to know that even when the patients not present morphological brain changes after minimal TBI, with frequency they present difficulty of concentration, impaired executive functions, depression, apathy, anxiety, and various degrees of amnesia and impairment of memory (KIBBY & LONG, 1996; ARCINIEGAS et al., 1999;

MARGUILES, 2002). Several researches along of years had been contributing with several elements about memory, including its neuroanatomy and neurophysiology bases, which come elucidate types of memory and mechanisms involved with them respective structures and disturbances (THOMPSON, 1986; MISHKIN & APPENZELLER, 1987; SQUIRE, 1992; ZOLA-MORGAN & SQUIRE, 1993; PETRI & MISHKIN, 1994; SCHACTER & BUCKNER, 1998; BUCKNER, 2000). In line with this, a simple organochalcogenide, the diphenyl diselenide, (PhSe)₂, have been showed interesting biological properties like anti-oxidant (LUCHESE et al., 2007; BARBOSA et al., 2008) suitability in produce antinociception in several models of pain (SAVEGNAGO et al., 2007), antiulcer activity via inhibition of gastric K⁺-ATPase activity (SAVEGNAGO et al., 2006). Furthermore, (PhSe)₂ have been demonstrated possess some effects on Central Nerve System (CNS), more specifically on memory, depression, seizures, dyskinesia and anxiety (SAVEGNAGO et al., 2007; BURGER et al., 2006; ROSA et al., 2003). Nevertheless, (PhSe)₂ have been showed to alter the bioenergetic metabolism in rat models including CNS (BARBOSA et al., 2006; GHISLENI et al., 2003). Thereby, the purpose of this study was to investigate the effect of (PhSe)₂ before and post TBI induction in rats and evaluate a possible ameliorate of some parameters involved in sequels like loss of memory.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Male Wistar rats (230–250 g) were housed in groups of 5 per cage on 12 h day/night cycle at a temperature of 22°C ± 2 with *ad libitum* access to water and standard lab chow (Nutrilab®, Curitiba, Paraná, Brazil).

2.2 Chemicals

Diphenyl diselenide was synthesized according to literature methods (Paulmier C, 1986). Analysis of the ^1H MNR and ^{13}C MNR spectra showed that the compound obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with their assigned structures. The chemical purity of $(\text{PhSe})_2$ (99%) was determined by GC/HPLC. All other chemicals were obtained from commercial suppliers.

2.3 Animals

Seventy-day-old, Wistar rats were used in the experiments. They were maintained at approximately 22°C, on a 12:12h light/dark cycle with free access of food and water until the end of experiments.

2.4 Traumatic Brain Injury (TBI)

TBI carried out essentially as described by Phol et al. (1998) [4;34], with some modifications. The animals were anesthetized intraperitoneously with 0.2 mL of ketamine plus xylazine (both 100 mg/100 g of rat weight) and placed immobilized on a stretcher until the end of the procedure. A skin incision was made to expose the skull surface to do a 0,5 cm hole. The injury device consisted of a hollow stainless steel tube 40 cm long. The device was kept perpendicular to the surface of the hole and guided a falling weight onto a circular footplate (2.0 mm in diameter) resting upon the surface of the dura mater. A force of 320 g·cm produced by a 20 g weight was selected to procedure brain injury. The coordinates in relation to lambda to make the hole were 4 mm anterior and 3 mm lateral. All the animals were subjected to brain injury except those belong to group I that only subjected to incision, anesthetic and prophylactic

penicillin administration I.M. – Sham group. All groups received 21.500 UI of penicillin as antibiotic prophylaxis 72 hours before TBI procedures. The experiments were performed in accordance with the local Animal Care Committee.

2.5 The treatments

The animals were divided into five groups. The Sham group that was described above, the (PhSe)₂ group, the TBI group, the pre-treatment group and treatment group. All groups were subject to anesthetic, prophylactic penicillin administration I.M., but only the last three groups were subjected to brain injury. The pretreatment group (PT + T) received by 4 days before brain injury (PhSe)₂ at dose 20 mM V.O. and after 15 minutes lesion ending performed. The treatment group (T) received 100 mM V.O. after 15 minutes lesion performed. At 24 hours after TBI the animals performed the spontaneous alternation and fear conditioned tasks.

2.6 Spontaneous Alternation Task (Y-Maze)

Immediate working memory performance was assessed by recording spontaneous alternation behavior during a single session in a Y-maze (SARTER, BODEWITZ, STEPHENS, 1988; BLISS, COLLINGRIDGE, 1993; HIRAMATSU, HYODO, KAMEYAMA, 1996; HLIŇÁK, KREJČÍ, 2006) with minor modification from the original report in rats (FOSTER et al, 1992). In this test, since exploratory, locomotion and motivational behaviors may affect the findings, selectivity for testing memory test may be weak and especially learning process in this task are not involved. Interesting to notify that Hiramatsu et al. (2005) found in their experiments some correlation the spontaneous alternation task in the Y-maze and the passive avoidance task. The behavioral testing was conducted between 08.00 and 12.00 h in the room illuminated

with a 25-W fluorescent tube (diffuse artificial light). The cross-arm-maze was made from brown plastic and consisted of four enclosed arms (50 cm×15 cm×15 cm) extending from a central open space (15 cm×15 cm). Thus, the animals visited the arms via a central space. The arms were covered with a removable board that made a cleaning easy. Individual arms were signed A–C. Always, the rat was placed at the central space and allowed to traverse the apparatus freely for 5 min while the number and sequence of arm entries was recorded visually. An entry was scored when all four feet crossed into the arm. The total number of arm entries was considered to reflect locomotion activity. An alternation was defined as entry into each of the three arms on consecutive entries.

Alternation was defined if rat entered different arms three times in succession from the results of consecutive arm entering. The number of overlapping entrance sequences (e.g. ABC, BCA) was defined as the number of alternations. The effect was calculated as percentage alternation according to the following formula: $\text{percent alternation} = (\text{number of alternations}) / (\text{total number of arm entries} - 2) \times 100$. In this test, rats had to memorize the arm that they entered immediately before the arm that they are in now. No animals were excluded from the subsequent analysis. It is important to note that our experimental approach did not involve reward memory process. It is known that exploratory behavior gradually decreases depending on habituation to an apparatus. In the Y-maze, as animals become used to the maze, exploratory behavior into the arm entries decrease and the arm that was previously entered tends to be avoided, while there is a tendency for rodents to enter a newer arm. Therefore, we used this percentage alternation as one index of short-term memory. We also showed the total number of arm entries in the figures as an index of locomotion activity, although it is not direct evidence.

2.7 Startle Task

The objective of *Startle Task* was evaluated if animals were able to perceive and react to sound stimuli. This task was performed as describe previously by Smart and Dobbing (1971) with some modification. To perform the task each rat was placed room separated of others into apparatus consisted of opaque plastic cage set in a side of sound apparatus that emitted 90dB sound at 2000 Hz when turned on. Furthermore, after an adaptation period of 3 minutes at room without any noise the auditory stimuli was delivered for 1 second. The response was considered present if the rat suddenly moves the body after stimuli delivery. The cage was cleaned with 30% ethyl alcohol before and after each rat occupied it.

2.8 Fear Conditioned Task

The *Fear Conditioned* task was performed, as described previously by Fanselow et al. (1994) with some modification. The apparatus consisted of a transparent acrylic rectangular cage (30 cm×30 cm×40 cm high) comprising a grid floor, set in a side of sound apparatus utilized in *Startle Task*. The lateral walls of the chamber were made of steal, whereas the front wall was made of translucent acrylic plastic to allow observation of the animals. There was no background noise. The cage was cleaned with 30% ethyl alcohol before and after each rat occupied it. Illumination was provided by a 25 W illumination lamp above the apparatus. An electric current (1 Hz, 500 ms, 60 V dc) was delivered to the grid floor by an isolated stimulator (Insight®, Brazil). In the training test, each rat was placed on the grid floor by 15 minutes and each 3 minutes a sound stimulus was discharged by 20 seconds. So immediately at final of sound stimulus an electric shock was delivered for 1 second. A retention test was carried out 24 hour after the training session, in a manner similar to the training,

except that no electric shock was delivered to the grid floor. Each rat was placed on the grid floor and the latency for movements was recorded. An upper cut-off time of 180 seconds was set. Freezing responses during this period were recorded as immediate freezing (TANG et al., 2001). Immediate freezing and spontaneous locomotion were recorded only in those experiments designed to evaluate whether (PhSe)₂ modulate acquisition of contextual and auditory fear conditioning. In the end test, each rat was placed back in the cage in room.

2.9 Statistical Analysis

The data from spontaneous alternation task were analyzed non-parametrically. To compare the differences among groups, the Kruskal–Wallis analysis was used. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$ (two tailed). To analyze the data from auditory startle and fear-conditioned tasks was used one-way ANOVA post hoc Duncan's test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

3. Results

The startle task is shown on table 1 when all groups demonstrated responsive capacity where subjected to auditory stimulus even the animals were subjected to TBI.

On figure 1 is showed the gradual development of acquisition of memory in all groups before TBI and treatments on pretraining through the length of latency freezing after the sound stimulus that preceded the electroshock when the animals were carrying out to novel context.

Figure 2 show the effects on long-term memory after TBI in pretreatment and treatment presence or absence on freezing and anxiety behaviors, measured by latency time to spontaneous locomotion. Statistical analysis (Kruskal-Wallis test) revealed that (PhSe)₂ was not able to increase freezing to context and freezing to tone. However the pretreatment with (PhSe)₂ seems to showed a tendency to ameliorate or to preserve the acquisition of auditory and contextual fear conditioning. The (PhSe)₂ administration in treatment group post-trauma showed an impaired freezing to context and to auditory stimulus similarly to TBI group.

Figure 3 and 4 shows the effects on long-term memory after TBI in pretreatment and treatment presence or absence on anxiety behaviors, measured by urinary activity and defecations, respectively. Statistical analysis (Kruskal-Wallis test) revealed that (PhSe)₂ increased urinary activity to freezing to context and freezing to tone on pretreatment group. However so how much pretreatment as treatment groups with (PhSe)₂ demonstrated a tendency to ameliorate or to preserve the acquisition of auditory and contextual fear conditioning demonstrated by defections number, which could be indicating an increase to anxiety behavior and some positive effect on memory capacity. These results when compared with TBI group shown a clear impairment of cognitive activity on animals subject to trauma without any treatment with (PhSe)₂.

Figure 5, 6 and 7 shows the behavior on spontaneous alternation (Y-maze). In this task were evaluated the deambulation, number of alternations and errors of spontaneous alternation, respectively. Statistical analysis (Kruskal-Wallis test) showed that the groups that received (PhSe)₂ treatments associated with to TBI demonstrated a tendency toward the response levels of deambulation by sham and (PhSe)₂ groups. When evaluated the number of alternation, only the pretreatment group showed some tendency to ameliorate the response, if compared with control groups. In this parameter, as TBI such as treatment groups were not able to express any tendency to

ameliorate the number of alternation. On the other hand, the (PhSe)₂ pretreatment and treatment groups were able to almost reach the performance of sham and (PhSe)₂ groups when was evaluated the number of error on spontaneous alternation.

In fact, these results express a clearly effect of (PhSe)₂ on acquisition of memory and facilitation of long-term memory.

Table 1. Presence (p) or absence (a) of auditory sensibility when the rats were

Groups	Number of animals per group	Sensibility to sound stimulus
Sham	n = 8	p
(PhSe) ₂	n = 8	p
TBI	n = 8	p
PT + T	n = 10	p
T	n = 10	P

subjected to sound stimulus

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

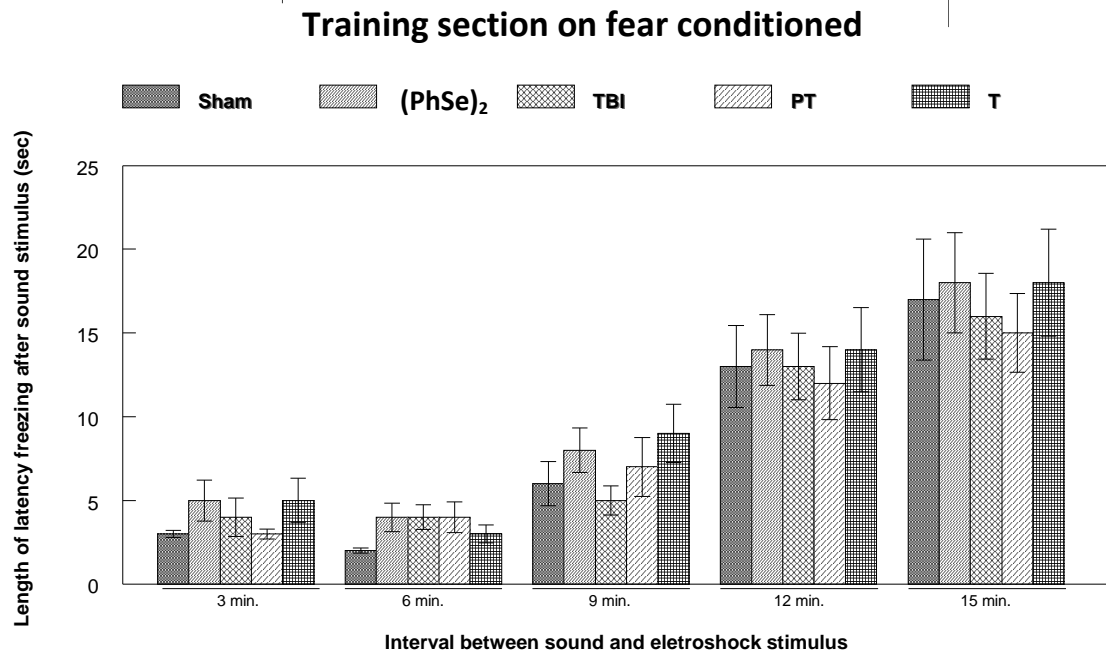


Figure 1. Length of latency freezing after sound stimulus delivery five times on pretraining task before of the TBI induction. Data are reported as means \pm SEM; with $P < 0.05$ (one-way ANOVA post hoc Duncan's test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

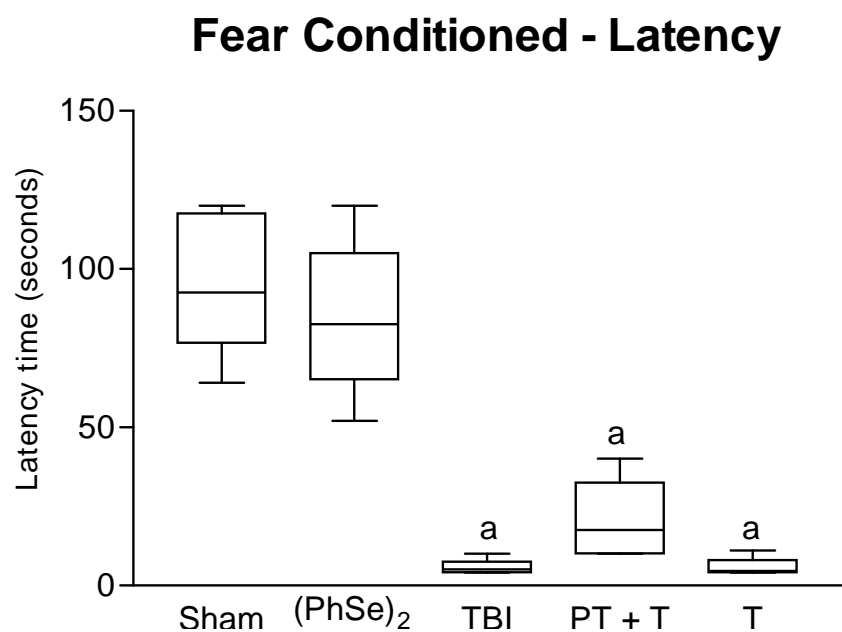


Figure 2. Latency to body movements on conditioned fear task. Data are reported as means \pm SEM, ^a Significantly different from Sham and (PhSe)₂ groups, $P < 0,05$ (one-way ANOVA post hoc Duncan's test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

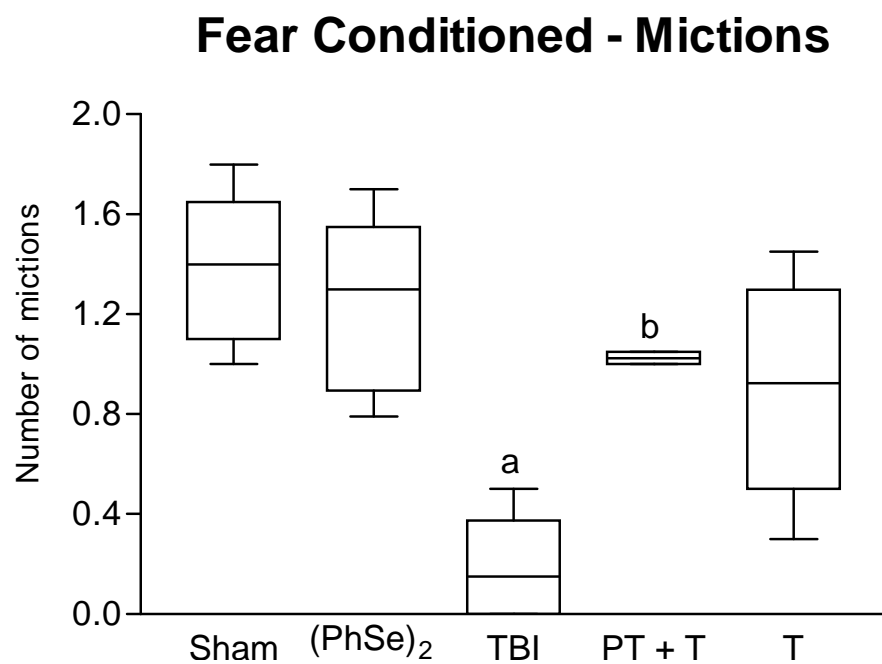


Figure 3. Number of mictions on conditioned fear task. Data are reported as means \pm SEM of 8 or 10 rats, ^a Significantly different from Sham and (PhSe)₂ groups; ^b Significantly different from TBI group; Both with $P < 0,05$ (one-way ANOVA post hoc Duncan's test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

Fear Conditioned - Defecations

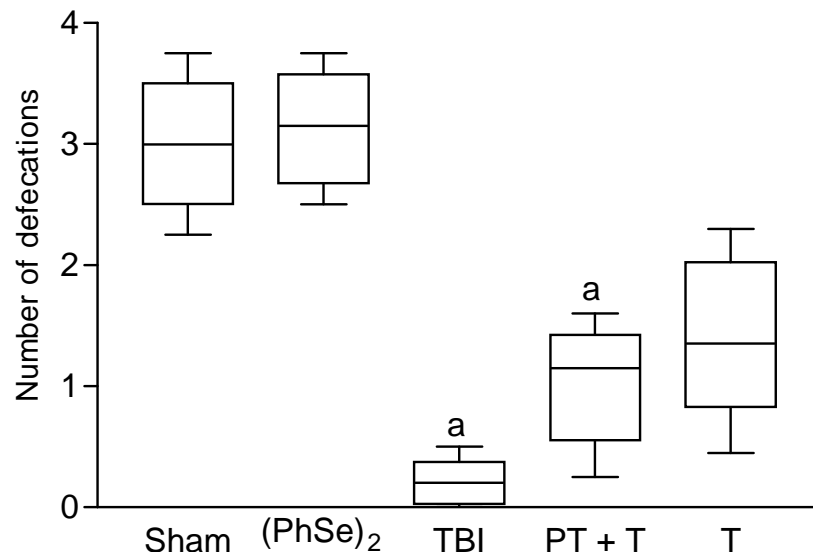


Figure 4. Number of defections on conditioned fear task. Data are reported as means \pm SEM, ^a Significantly different from Sham and (PhSe)₂ groups, $P < 0,05$ (one-way ANOVA post hoc Duncan's test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

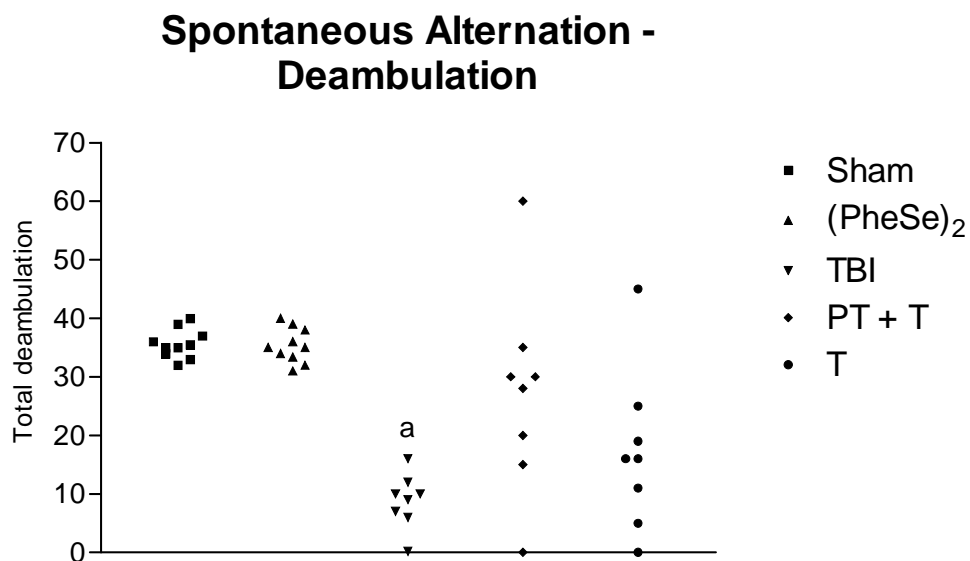


Figure 5. Deambulation on spontaneous alternation task (Y-maze). Data are reported as means \pm SEM of 8 or 10 rats, ^a Significantly different from sham and (PhSe)₂ groups, $P < 0.0001$ (Kruskal-Wallis test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

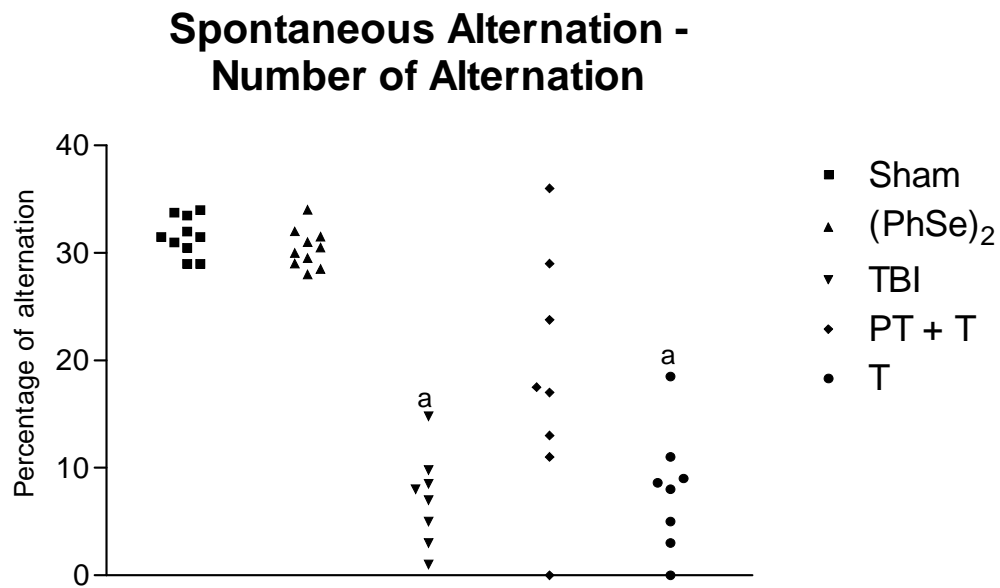


Figure 6. Number of alternations on spontaneous alternation task (Y-maze). Data are reported as means \pm SEM of 8 or 10 rats, ^a Significantly different from Sham and (PhSe)₂ groups, $P < 0,0001$ (Kruskal-Wallis test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

4. Discussion

The long-term memory assayed in these experiments and hippocampal activity through conditioned fear and spontaneous alternation showed some interesting aspects about the interference or tendency of (PhSe)₂ in memory acquisition and facilitation of memory against TBI induction.

Inhibitory avoidance and contextual conditioned fear have been used to study the involvement of hippocampus, anterior rostral cingulated cortex (rACC) and basolateral amygdala (BLA) in modulating the consolidation of different kinds of information, when hippocampus and rACC play a selective role in memory for specific components of training experiences (MALIN & McGAUGH, 2006).

Moreover, for long-term memory formation it has been accepted that the participation of transcriptional and translation mechanisms in several selective areas of neuronal systems is necessary (DAVIS & SQUIRE, 1984; YIN and TULLY, 1996; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; IMPEY et al., 1998; SILVA et al., 1998), in which the hippocampus has a participation in acquisition and consolidation, using protein synthesis, specially of a hippocampal-dependent reconsolidation phase (ROSSATO et al., 2007).

In line with this, CREB has been established like a transcriptional factor associated to adaptive neuronal response that triggers the bio-signalization regulated by calcium-dependent proteins of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which is highly expressed in the cortex and hippocampus (TAO et al., 1998; TABUSHI et al., 2000; BEKINSCHTEIN et al., 2008; SILVA et al., 2008).

The researches about (PhSe)₂ have been demonstrated an evident correlation with memory and neurochemistry. The (PhSe)₂ showed, indeed, a facilitation of long-term object recognition memory by i.p. administration in mice (ROSA et al., 2003). In addition, the (PhSe)₂ was able to simulate the adenylyl ciclase (NOGUEIRA et al.,

2001) and MAPK via (STAPLETON et al., 1997), that are important pathway mechanisms involved on memory acquisition and facilitation.

Furthermore, several experiments showed the involvement of cAMP-responsive transcription, mediated by the cAMP response element-binding protein (CREB), a family of proteins that is crucial for establishment of long-term memory (GUZOWSKI and MCGAUGH, 1997; LAMPRECHT et al., 1997; IMPEY et al., 1998; SILVA et al., 1998; VIOLA et al., 2000; CAMMAROTA et al., 2007). When these pathways above described were stimulated, the memory acquisition and/or memory facilitation are enhanced as consequence. However, when the same pathways are inhibited, the memory capacity is impaired (BACH et al., 1999; ATKINS et al., 1998; ORBAN, CHAPMAN, BRAMBILLA, 1999; WALZ et al., 2000^a; WALZ et al., 1999^b; BEVILAQUA et al., 2007). These findings reiterate our outcomes involving (PhSe)₂, particularly in rats subjected to TBI as in this work, indicating its probable participation on enhancing the acquisition and facilitation memory.

in other research, the (PhSe)₂ intriguingly showed an inhibitory effect on glutamatergic system increasing its uptake, which is paradoxical with the memory acquisition, once it is known that glutamate is crucial neurotransmitter on acquisition of long-term memory (NOGUEIRA et al., 2001). So these findings about (PhSe)₂ lead us to propose that (PhSe)₂ could perhaps modulate the memory mechanism without inducing behavioral neurotoxicity at utilized dose and via.

In addition, it has been known that CNS tries to be resistant to fluctuations of selenium levels, suggesting that selenium is important to normal CNS functions (BEHNE et al., 1988). In fact, the presence of selenium increases the neuroprotection against reactive oxygen species which induce cell damage (SCHWEIZER et al., 2005), and its decrease could promote deficiency on cognitive capacity and synaptic functions on hippocampus areas leading to a disruption in acquisition of spatial learning and

memory, once the synaptic transmission is altered and short-term and long-term synaptic plasticity is severely disrupted in CA1 area of hippocampus (MALIN et al., 2006).

Actually, it was possible to observe in the latency time on fear conditioned task that pretreatment group presented a tendency in ameliorate the response on the test. This was possible maybe due the (PhSe)₂ properties described above, in particularly the engagement of transcription factors activated by (PhSe)₂ and its neuroprotection, such as the glutamate uptake, the anti-inflammatory, antinociceptive, and antioxidant effects in several tissues (ROSA et al., 2007; LUCHESE et al., 2007; SAVEGNAGO et al., 2007; BARBOSA et al., 2008; GHISLENI et al., 2008). These data are reinforced by our findings in this work through the mictions and defecations outcomes of individuals when subjected to ring tone in the cage and by different responses between groups. As seen on figure 2 and 3, the TBI group showed a minor number of defecation and mictions than in pretreatment and treatment groups, which lead us to suppose a decrease of anxious behavior when compared with other groups subjected to TBI that received some treatment with (PhSe)₂. It has been accepted an indirect existence of correlation with the capacity to maintain the acquisition memory or facilitation memory capacity through a negative stimulus present on the task when the most anxious behavior revealed a better development and maintenance of acquired memory in some nervous structures involved in the responses to the stimulus which depend of acquired memory, like cortex, striatum and hippocampus (MEDINA et al., 2008). It is probable that (PhSe)₂ could be effective in preserving the ability of the functions of these structures, at least in part, enhancing the memory capacity after the TBI. In line with this, in other experiment using ⁴⁵Ca⁺², the (PhSe)₂ was able to ameliorate the uptake of calcium membrane (data not published) that support us to suggest a direct correlation with membrane integrity as one of the possible responses of (PhSe)₂ against to TBI and its consequences, like loss of memory. The activation of calcium channels voltage

dependent indeed increases the BDNF mRNA level which triggers CREB family proteins, leading to the deflagration of acquisition and facilitation of memory, as well of the neuroprotection (ZAFRA et al, 1990, 1991; GOSH et al., 1994).

The findings presented on spontaneous alternation task (Y-maze) came to corroborate with the results obtained on conditioned fear if the memory acquisition is considered. In this task we could observe that deambulation and number of alternation was not significant if compared with the Sham and (PhSe)₂ group, reveling the impact of TBI on other groups, perhaps by the impact beyond motor behaviors. However, when the number of errors entry in Y-maze arms is analyzed, the results lead us to suppose an interference of (PhSe)₂ on acquisition memory with possible partial protection and preservation on physiological hippocampus and consequent mechanisms involved in memory acquisition, such as before and after (PhSe)₂ administration at utilized dose and via against the TBI.

In conclusion, the (PhSe)₂ pretreatment and treatment ameliorate the acquisition and facilitation of memory of rats subjected to TBI. These results could be associated with the (PhSe)₂ properties, took together with some involvement in biochemistry metabolism which is present in acquisition and facilitation of memory. Finally, these outcomes suggest that (PhSe)₂ has a pharmacological therapeutic potential against TBI consequences, like memory loss. Nevertheless, more attempts to clarify the exact involvement of (PhSe)₂ in the acquisition and facilitation of memory are needed.

5. Reference

Arciniegas, D.; Adler, L.; Topkoff, J.; Cawthra, E.; Filley, C.M.; Reite, M. Attention and memory dysfunction after traumatic brain injury: Cholinergic mechanism, sensory gating, and a hypothesis for further investigation. *Brain Injury*, v.13, p.1-13, 1999.

Atkins, C.M.; Selcher, J.C.; Petraitis, J.J.; Trzaskos, J.M.; Sweatt, J.D. The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nat. Neurosci.*, v.1, p.602-609, 1998.

Bach, M.E.; Barad, M.; Son, H.; Zhuo, M.; Lu, Y-F.; Shih, R.; Mansuy, I.; Hawkins, R.D.; Kandel, E.R. Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.96, p.5280-5285, 1999.

Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Wondracek, D.C., Perottoni, J., Zeni, G., and Nogueira, C.W. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. *Chem-Biol. Interact.*, v.163, p.230-238, 2006.

Barbosa, N.B.V., Rocha, J.B.T., Soares, J.C.M., Wondracek, D.C., Gonçalves, J.F., Schetinger, M.R.C., and Nogueira, C.W. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.*, v.46(1), p.186-194, 2008.

Behne D.; Hilmert H.; Scheid S.; Gessner H.; Elger W. Evidence for specific selenium target tissues and new biologically important selenoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 966, p.12-21, 1988.

Bekinschtein, P.; Cammarota, M.; Katzev, C.; Slipczuk, L.; Rossato, J.I.; Goldin, A.; Izquierdo, I.; Medina, J.H. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v 105, n.7, p.2711–2716, 2008.

Bevilaqua, L.R.; Rossato, J.I.; Clarke, J.H.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks extinction of inhibitory avoidance memory. *Behav. Pharmacol.*, v.18(5-6), p.483-489, 2007.

Bliss T.V.P.; Collingridge G.L. A synaptic model of memory long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, v. 361, p.31–39, 1993.

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

Cammarota, M.; Bevilqua, L.R.; Medina, J.H.; Izquierdo, I. ERK1/2 and CaMKII-mediated events in memory formation: Is 5HT regulation involved? *Behav. Brain Res.*, v.195(1), p.120-128, 2008.

Davis, H.P; Squire, L.R. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol. Bull.*, v.96, p.518–559, 1984.

Fanselow M.S.; Kim J.J. Acquisition of contextual Pavlovian fear conditioning is blocked by application of an NMDA receptor antagonist D,L-2-amino-5-phosphonovaleric acid to the basolateral amygdala. *Behav. Neurosci.*, v.108, p.210–212, 1994.

Foster A.C.; Kemp J.A.; Leeson P.D.; Grimwood S.; Donald A.E.; Marshall G.R.; Priestley, T.; Smith, J.D.; Carling, R.W. Kynurenic acid analogues with improved affinity and selectivity for the glycine site on the N-methyl-d-aspartate receptor from rat brain. *Mol. Pharmacol.*, v.41, p.914-22, 1992.

Gaetz, M. The neurophysiology of brain injury. *Clin. Neurophysiol.*, v.115, p.4-8, 2004.

Ghisleni, G.C.; Porciúncula, L.O.; Cimarosti, H.; Rocha, J.B.T.; Salbego, C.G.; Souza, D.O. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoreactivity. *Brain Res.*, v.986, p.196-199, 2003.

Ghisleni, G.; Kazlauskas, V.; Both, F.L.; Pagnussat, N.; Mioranza, S.; Rocha, J.B.; Souza, D.O.; Porciúncula, L.O. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: Putative roles of GABAA and 5HT receptors. *Prog. Neuropsychopharm. Biol. Psychiatry*, v.32(6), p.1508-1515, 2008.

Ghosh, A.; Carnahan, J.; and Greenberg, M.E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*, v.263, p.1618–1623, 1994.

Guzowski, J.F.; McGaugh, J.L. Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.94, p.2693–2698, 1997.

Hiramatsu M.; Hyodo T.; Kameyama T. U-50,488H, a selective μ -opioid receptor agonist, improves carbon monoxide-induced delayed amnesia in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, v.315, p.119–125, 1996.

Hlíňák Z., Krejčí I. Spontaneous alternation behaviour in rats: Kynurenic acid attenuated deficits induced by MK-801. *Behav. Brain Res.*, v.168(1), p.144-149, 2006.

Impey, S.; Smith, D.M.; Obrietan, K.; Donahue, R.; Wade, C.; Storm, D.R. Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning. *Nat. Neurosci.*, v.1, p.595–601, 1998.

Izquierdo, I.; Medina, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol. Learn Mem.*, v.68, p.285–316, 1997.

Kibby, M.Y.; Long, C.J. Minor head injury: attempts at clarifying the confusion. *Brain Injury*, v.10, p.159-186, 1996.

Kraus, J.F. and Nourjah, P. The epidemiology of mild, uncomplicated brain injury. *J. Trauma*, v.28, p.1637-1643, 1998.

Lee, J.A.; Lee, S.H.; Lee, C.; Chang, D.J.; Lee, Y.; Kim, H.; Cheang, Y.H.; Ko, H.G.; Lee, Y.S.; Jun, H.; Bartsch, D.; Kandel, E.R.; Kaang, B.K. PKA-activated ApAF-ApC/EBP heterodimer is a key downstream effector of ApCREB and is necessary and sufficient for the consolidation of long-term facilitation. *J. Cell Biol.*, v.174, p.827-838, 2006.

Lei X.G.; Cheng W.H. New roles for an old selenoenzyme: evidence from glutathione peroxidase-1 null and overexpressing mice. *J Nutr.*, v.135, p.2295-2298, 2005.

Liou, A.K.F.; Clark, R.S.; Henshall, D.C.; Ying, X-M.; Chen, J. To die or not to die in neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog. Neurobiol.*, v.69, p.103-142, 2003.

Luchese C., Sthangerlin, E.C., Ardais, A.P., Nogueira, C.W., and Santos F.W. Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. *Toxicology*, v.230, p.189-196, 2007.

Malin, E.L.; McGAUGH J.L. Differential involvement of the hippocampus, anterior cingulate cortex, and basolateral amygdala in memory for context and footshock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.103(6), p.1959-1963, 2006.

Masayuki H.; Mizuno, N.; Kanematsu, K. Pharmacological characterization of the ameliorating effect on learning and memory impairment and antinociceptive effect of KT-95 in mice. *Behav. Brain Res.*, v.160, p.374-381, 2005.

Margulies, S. The postconcussion syndrome after mild head trauma: is brain damage overdiagnosed? *J. Clin. Neurosci.*, v.7, p.400-408, 2002.

Medina, J.H.; Bekinschtein, P.; Cammarota, M.; Izquierdo, I. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? *Behav. Brain Res.*, v. 192(1), p.61-69, 2008.

Mishkin, M.; Appenzeller, T. The anatomy of memory. *Sci. Am.*, v.256(6), p.80-89, 1987.

Nogueira, C.W.; Rotta, L.N.; Perry, M.L.; Souza, D.O.; Rocha, J.B. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system "in vitro" and "In vivo". *Brain Res.*, v.906, p.157-163, 2001.

Orban, P.C.; Chapman, P.F.; Brambilla, R. Is the Ras-MAPK signaling pathway necessary for long-term memory formation? *Trends Neurosci.*, v.22, p.38-44, 1999.

Peters, M.M.; Hill, K.E.; Burk, R.F.; Weeber, E.J. Altered hippocampus synaptic function in selenoprotein P deficient mice. *Mol. Neurodegen.*, v.1, p.1-12, 2006.

Petri, H.; Mishkin, M. Behaviorism, cognitivism, and the neuropsychology of memory. *Am. Sci.*, v.83, p.30-37, 1994.

Pohl, D.; Bittgau, P.; Ishimaru, M.J.; Stadthaus, D.; Hübner, C.; Olney, J.W.; Turski, L. and Ikonomidou, C. N-Methyl-D-Aspartate antagonists and apoptotic cell death

triggered by head trauma in developing rat brain. *Pharmacology*, v.96(5), p.2508-2513, 1999.

Rosa, R.M.; Flores, D.G.; Appelt, H.R.; Braga, A.L.; Henriques, J.A.P. and Roesler, R. Facilitation of long-term object recognition memory by pretaining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci. Lett.*, v.341, p.217-220, 2003.

Rosa, R.M.; Roesler, R.; Braga, A.L.; Saffi, J.; Henriques, J.A. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.40(10), p.1287-1304, 2007.

Rossato, J.I.; Bevilaqua, L.R.M.; Myskiw, J.C.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. On the role hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Learn Mem.*, v.14, p.36-46, 2007.

Sarter M.; Bodewitz G.; Stephens D.N. Attenuation of scopolamine induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and agonist-carbolines. *Psychopharmacology*, v.94, p.491-495, 1988.

Savegnago, L.; Trevisan, M.; Alves, D.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.21, p.86-92, 2006.

Savegnago, L.; Pinto, L.G.; Jesse, C.R.; Alves, D. Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.*, v.555, p.129-138, 2007.

Savegnago, L.; Jesse, C.R.; Pinto, L.G.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. *Progr. Neuro-Psychopharm. Biol. Psychiatry*, v.31, p.1261-1269, 2007.

Schacter, D.L.; Buckner, R.L. Priming and the brain. *Neuron*, v.20, p.185-195, 1998.

Shaw, N. A. The neurophysiology of concussion. *Prog. Neurobiol.*, v.67, p.281-344, 2002.

Schweizer U.; Streckfuss F.; Pelt P, Carlson B.A.; Hatfield D.L.; Kohrle J.; Schomburg L. Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochem. J.* v.386, p.221-226, 2005.

Silva, A.J.; Kogan, J.H.; Frankland, P.W.; Kida, S. CREB and memory. *Ann. Rev. Neurosci.*, v.21, p.127-148, 1998.

Silva, W.C.; Bonini, J.S.; Bevilaqua, L.R.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory. *Hippocampus*, v.18(1), p.29-39, 2008.

Smart, J.L.; Dobbing J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Res.*, v.28, p.85-95, 1971.

Squire, L.R. Memory and hippocampus: A synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psych. Rev.*, v.99, p.195-231, 1992.

Stapleton, S.R.; Garlock, G.L.; Foellmi-Adams, L.; Kletzien, R.F. Selenium: potent stimulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP kinase. *Biochem. Biophys. Acta*, v.1355, p.259-269, 1997.

Tabuchi, A.; Nakaoka R.; Amano K.; Yukimine M.; Andoh T.; Kuraishi Y.; Tsudai M. Differential Activation of Brain-derived Neurotrophic Factor Gene promoters I and III by Ca²⁺ Signals Evoked via L-type Voltage-dependent and N-Methyl-D-aspartate Receptor Ca²⁺ Channels. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.17269-17275, 2000.

Tang Y.P.; Wang H.; Feng R.; Kyin M.; Tsien J.Z. Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*, v.41, p.779–790, 2001.

Tao X.; Finkbeiner S.; Arnold, D.B.; Shaywitz, A.J.; Greenberg, M.E. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, v.20, p.709-726, 1998.

Thomson, R.F. The neurobiology of learning and memory. *Science*, v.223, p.941-947, 1986.

Viola, H.; Furman, M.; Izquierdo, L.A.I.; Alonso, M.; Barros, D.M.; Souza, M.M.; Izquierdo, I.; Medina, J.H. Phosphorylated cAMP response element binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. *J. Neurosci.*, v.20, p.1-5, 2000.

Walz, R.; Lenz, G.; Roesler, R.; Vianna, M.M.; Martins, V.; Brentani, R.; Rodnight, R.; Izquierdo, I. Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerve growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats. *Eur. J. Neurosci.*, v.12, p.2185-2189, 2000^a.

Walz, R.; Rockenbach, I.C.; Amaral, O.B.; Quevedo, J.; Roesler, R. MAPK and memory. *Trends Neurosci.*, v.22, p.495, 1999^b.

Yin, J.C.P.; Tully, T. CREB and the formation of long-term memory. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v.6, p.204–208, 1996.

Zafra, F.; Hengerer, B.; Leibrock, J.; Thoenen, H.; and Lindholm, D. Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J.*, v.9, p.3545–3550, 1990.

Zafra, F.; Castreñón, E.; Thoenen, H.; and Lindholm, D. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.88, p.10037–10041, 1991.

Zola-Morgan, S.M.; Squire, L.R. Neuroanatomy of memory. *Ann. Rev. Neurosci.*, v.16, p.547-563.

Zohr, O.; Schreiber, S.; Getslev, V.; Schwartz, J.P.; Mullins, P.G.; Pick, C.G. Close-head minimal traumatic brain injury produces long-term cognitive deficits in mice. *Neurosci.*, v.118, p.949-955, 2003.

3.3 Manuscrito III

Open field and rota-rod behaviors in rats subjected to trauma brain injury (TBI):**Diphenyl Diselenide attenuated deficits on neurolocomotor system.**

Oliveira, LFS; Puntel, RL; Perottoni, J; Rocha, JBT; Nogueira, CW.

Departamento de Química, CCNE, Universidade Federal de Santa Maria,

Santa Maria/RS, Brazil, Toxicological Biochemistry Post-Graduate Program.

ABSTRACT

Diphenyl diselenide, (PhSe)₂, is an organoselenium compound that affects a number of neuronal processes. The effect of this compound on neuromotor system was evaluated in Wistar rats subjected to TBI. The neurolocomotor abilities were recorded at pre-training period. The behavioral changes in the open-field and rota-rod tasks were performed in 24 hours after TBI. The (PhSe)₂ was able to increase the locomotor activity in open-field task as well as an anxiolytic-like effect. Specifically, when the (PhSe)₂ was administered before and after to TBI. On rota-rod task reiterated the findings observed on open field, with a locomotor coordination response present in both (PhSe)₂ treatments, with distinction to pretreatment. We concluded that pretreatment and treatment with (PhSe)₂ can ameliorate the locomotor damages induced by TBI in Wistar rats at dose and via utilized.

Key words: selenium, TBI, neuroprotection, and locomotor activity.

1. Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is one of major forms of acute brain injury that could lead to significant neuronal cell death, which has clinical manifestation as losses in neurological functions, especially in humans under the age of 50 (SHAW, 2002; LIOU et al., 2003). This neural disturbance is frequently induced by a sudden acceleration and deceleration forces of the head usually without skull fracture (GAETZ, 2004). Falls, collisions, road traffic accidents and contact sports are among the mains causes of this cerebral damage (KRAUS and NOURJAH, 1998; GAETZ, 2004). In addition, victims of TBI suffer short and long-term physical, cognitive, behavioral and emotional impairments that depend on the severity of the injury (ZOHAR et al., 2003). In line with this, a simple organochalcogenide, the diphenyl diselenide, $(\text{PhSe})_2$, have been showed interesting biological properties like anti-oxidant (LUCHESE et al., 2007; BARBOSA et al., 2008) suitability in produce antinociception in several models of pain (SAVEGNAGO et al., 2007), antiulcer activity via inhibition of gastric K^+ -ATPase activity (SAVEGNAGO et al., 2006). Furthermore, $(\text{PhSe})_2$ have been demonstrated possess some effects on Central Nervous System (CNS), more specifically on memory, depression, seizures, dyskinesia and anxiety (SAVEGNAGO et al., 2007; BURGER et al., 2006; ROSA et al., 2003). Nevertheless, $(\text{PhSe})_2$ have been showed to alter the bioenergetic metabolism in rat models including CNS (BARBOSA et al., 2006; GHISLENI et al., 2003). Thereby, the purpose of this study was to investigate the effect of $(\text{PhSe})_2$ before and post TBI induction in rats and evaluate a possible ameliorate some parameters that usually are involved in sequels after TBI, like locomotor disturbances.

2. Material and Methods

2.1 Chemicals

Diphenyl diselenide, (PhSe)₂, was synthesized according to literature methods (Paulmier C, 1986). Analysis of the ¹H MNR and ¹³C MNR spectra showed that the compound obtained presented analytical and spectroscopic data in full agreement with their assigned structures. The chemical purity of diphenyl diselenide (99%) was determined by GC/HPLC. All other chemicals were obtained from commercial suppliers.

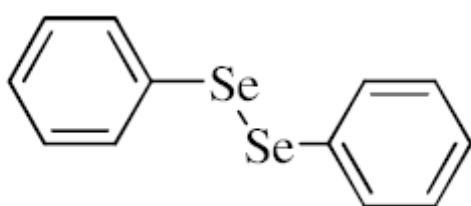


Figure 1. Chemical structure of (PhSe)₂.

2.2 Animals

Male Wistar rats (230–250 g) were used in the experiments and housed in groups of 5 per cage on 12h day/night cycle at a temperature of 22°C ±2 with *ad libitum* access to water and standard lab chow (Nutrilab®, Curitiba, Paraná, Brazil) until the end of experiments.

2.3 Traumatic Brain Injury (TBI)

TBI carried out essentially as described by Phol et al. (1998), with some modifications. The animals were anesthetized intraperitoneously with 0.2 mL of ketamine plus xylazine (both 100 mg/100 g of rat weight) and placed immobilized on a stretcher until the end of the procedure. A skin incision was made to expose the skull

surface to do a 0,5 cm hole. The injury device consisted of a hollow stainless steel tube 40 cm long. The device was kept perpendicular to the surface of the hole and guided a falling weight onto a circular footplate (2.0 mm in diameter) resting upon the surface of the dura mater. A force of 320 g·cm produced by a 20 g weight was selected to procedure brain injury. The coordinates in relation to lambda to make the hole were 4 mm anterior and 3 mm lateral. All the animals were subjected to brain injury except those belong to group I that only subjected to incision, anesthetic and prophylactic penicillin administration I.M. – Sham group. All groups received 21.500 UI of penicillin as antibiotic prophylaxis caution 72 hour before to TBI procedures. The experiments were performed in accordance with the local Animal Care Committee.

2.4 The treatments

The animals were divided in five groups. The Sham group that was described above, the (PhSe)₂ group, the TBI group, the pretreatment group and treatment group. All groups were subject to anesthetic, prophylactic penicillin administration I.M., but only the last three groups were subjected to brain injury. The pretreatment group (PT + T) received by 4 days before brain injury diphenyl diselenide at dose 20 µM V.O. and after 15 minutes lesion ending performed. The treatment group (T) received 100 µM V.O. after 15 minutes lesion performed. At 24 hours after TBI the animals performed the open field, and rota-rod tasks.

2.5 Open-field test

Spontaneous motor activity was measured in the open-field test using methods similar to those previously described by Stangherlin et al. (2006) with some modifications. The open field consisted of a wooden arena and surrounded by walls 30 cm in height. After placing an animal at the center of the arena (45x45 cm, the floor

was divided by black lines into nine equal squares 15×15 cm). The illumination was maintained by White light (fluorescent bulb, 100 lux at open field level). All times that finished the test with one animal, the arena was cleaned with alcohol 30%. This procedure also was made on rota-rod task. During the testing sessions, the animals were placed individually in the open field, and allowed to explore the arena for 6 min. Total area entries, central crossing (number of times the animals crossed one area with the four paws), and rears (both front feet off on the arena floor) and non exploratory behavior (stationary behavior) were counted in the session on day 1. After the rats were immediately subjected to TBI. Twenty-four hours later the performance on open field the task was again assed for all animals. The all observations were performed between 10.00 and 12.00 a.m.

2.6 Rota-rod test

The rota-rod test was performed on TBI and (PhSe)₂ treatments for measuring motor coordination skills with similar methods as those described previously (FAVERO et al., 2006). The rota-rod consisted of a wooden beam covered with masking tape (diameter: 7.5 cm, length: 30 cm), used for increasing the roughness of the texture and thereby providing a firm grip. The rod was flanked by two cardboard plates in order to prevent any escape and suspended at a height of 30 cm above the mat-covered table. The rat were placed upon the already revolving beam (10 rpm) and facing away from the experimenter's view in the orientation opposite to that of the beam movement in the longitudinal axis, so that forward locomotion was necessary in order to avoid a fall. Latencies to first fall and number of falls were recorded (time limit was 180 s). Immediately after the session on day 1, the rats were subjected to TBI. Twenty-four hours later the performance on rota-rod the task was again assed for all animals.

2.7 Statistical analysis

The data from open field task were analyzed by Kruskal–Wallis's test. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$ (two tailed). To analyze the data from rotarod task was used one-way ANOVA post hoc Newman-Keuls test to compare each treatment with the control group. Statistical significance was accepted when $P < 0.05$.

3. Results

In all evaluations realized there was possible to observe through the difference between 1 day, reported like training day, and 2 day, correspondent to test day, which there was not any interference by possible presence of peculiar and inherent characteristics from rats that could disguise some interpretation of groups performances on the tasks.

The findings from open field task could be visualized on figures 2. At Figure 2A shown the total areas explored by animals, when the pretreatment and treatment groups demonstrated a significantly statistic difference when compared with TBI group. With distinction to pretreatment group that presented a major exploration than Sham and (PhSe)₂ control groups. At figure 2B was evaluated the rears parameter, of whom there was not possible to observe any significantly statistic difference between TBI, pretreatment and treatment groups, however these same groups shown a significantly statistic difference when compared to control groups. At figure 2C and 2D are demonstrated the stationary behavior and central crossing, respectively, in which the TBI group shown a response significant and statistically different with higher stationary behavior and minor central crossing than control groups. In offset, the pretreatment and treatment groups showed interesting results with minor stationary behavior and major central crossing with significantly statistic difference in both parameters when compared with TBI group.

On the rota-rod task were evaluated the number of falls and latency time to falls in rats subjected and not subjected to TBI, with or without the presence of some kind of $(\text{PhSe})_2$ treatment. So at figure 3A it is possible to observe a worst ability of TBI group in maintain themselves upon the revolving beam on test day if compared with training day, as well as the performance on 2 day show a significantly statistic difference between TBI and control groups, i.e. sham and $(\text{PhSe})_2$ groups. On the other hand, although the pretreatment and treatment groups had presented a decrease in yours performance on test day if compared themselves with training day, these groups shown a response statistically different much better on test day if compared with performance demonstrated by TBI group. At figure 3B it is shown there was not difference in response presented by TBI, pretreatment and treatment groups. However, when the same groups are compared with control groups, it is evident the existence of difference, once time that in Sham and $(\text{PhSe})_2$ groups there was not falls on test day.

A Open-field - Total Area Entries

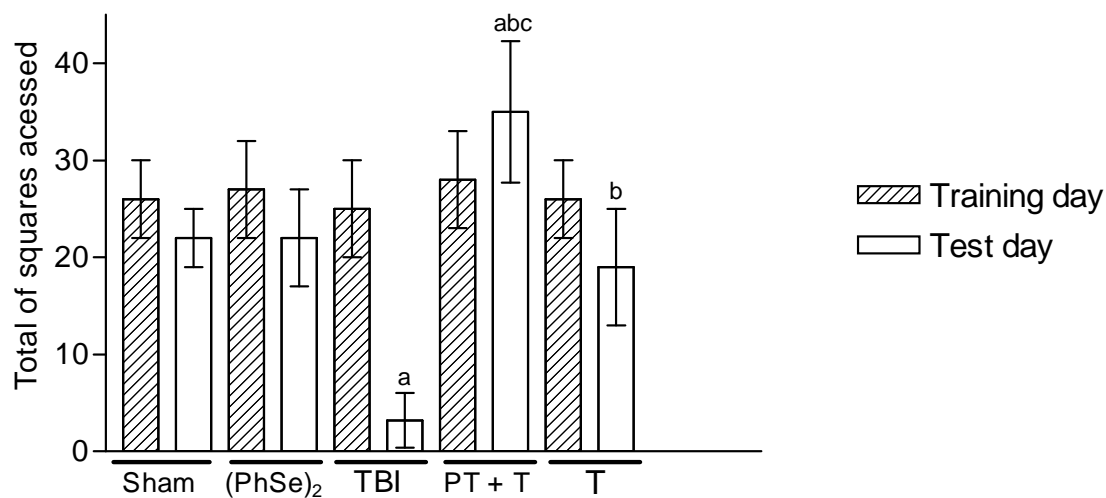


Figure 2 A. Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected or not to TBI on total area entries from open field task on training day and test day. Data are reported as means ± SEM of 10 rats, ^a Significantly different from sham and (PhSe)₂ groups; ^b Significantly different from TBI group; ^c Significantly different from T group; P<0,001 (Kruskal-Wallis test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

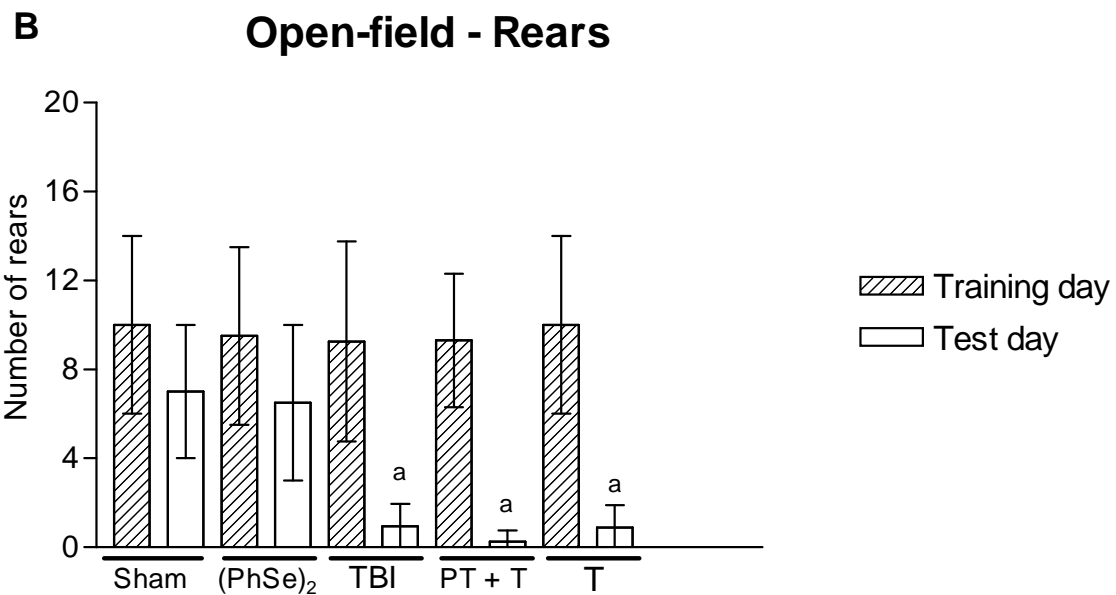


Figure 2 B. Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected or not to TBI on rears from open field task on training day and test day. Data are reported as means ± SEM of 10 rats, ^a Significantly different from sham and (PhSe)₂ groups, P<0,001 (Kruskal-Wallis test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

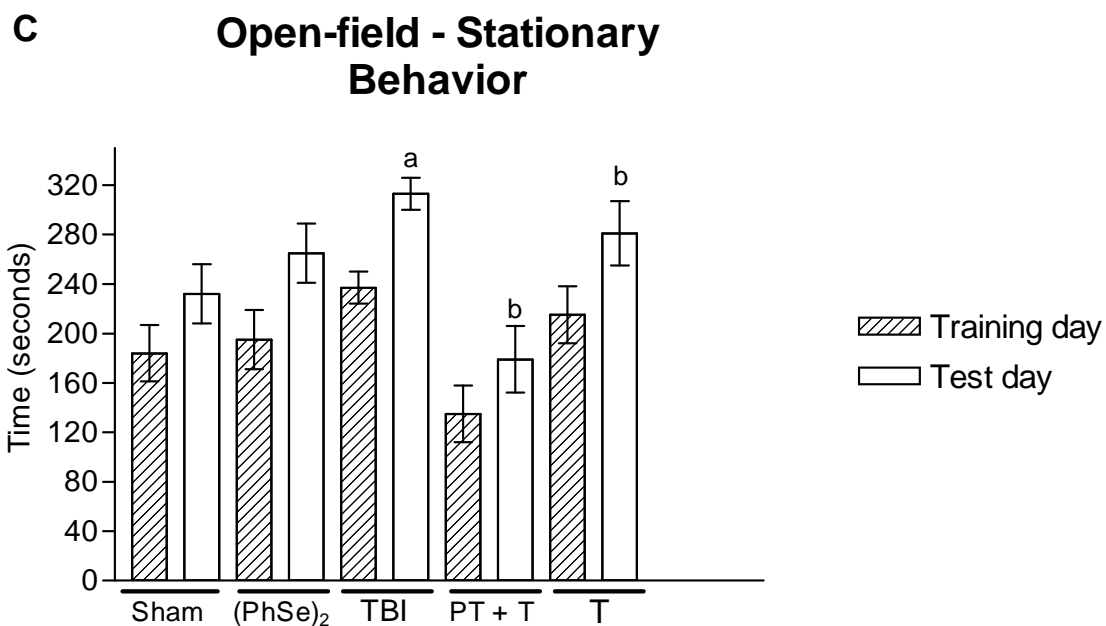


Figure 2 C. Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected or not to TBI on stationary behavior from open field task on training day and test day. Data are reported as means \pm SEM of 10 rats, ^a Significantly different from sham and (PhSe)₂ groups; ^b Significantly different from TBI group; both with $P < 0,001$ (Kruskal-Wallis test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

D Open-field - Central Crossing

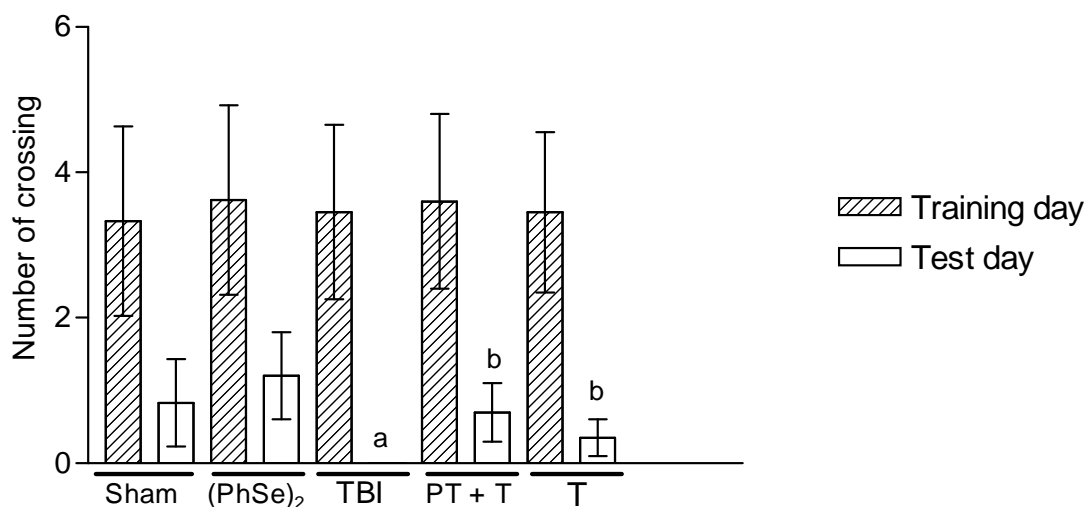


Figure 2 D. Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected or not to TBI on central crossing from open field task on training day and test day. Data are reported as means ± SEM of 10 rats, ^a Significantly different from sham and (PhSe)₂ groups; ^b Significantly different from TBI group; Both P<0,0001 (Kruskal-Wallis test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

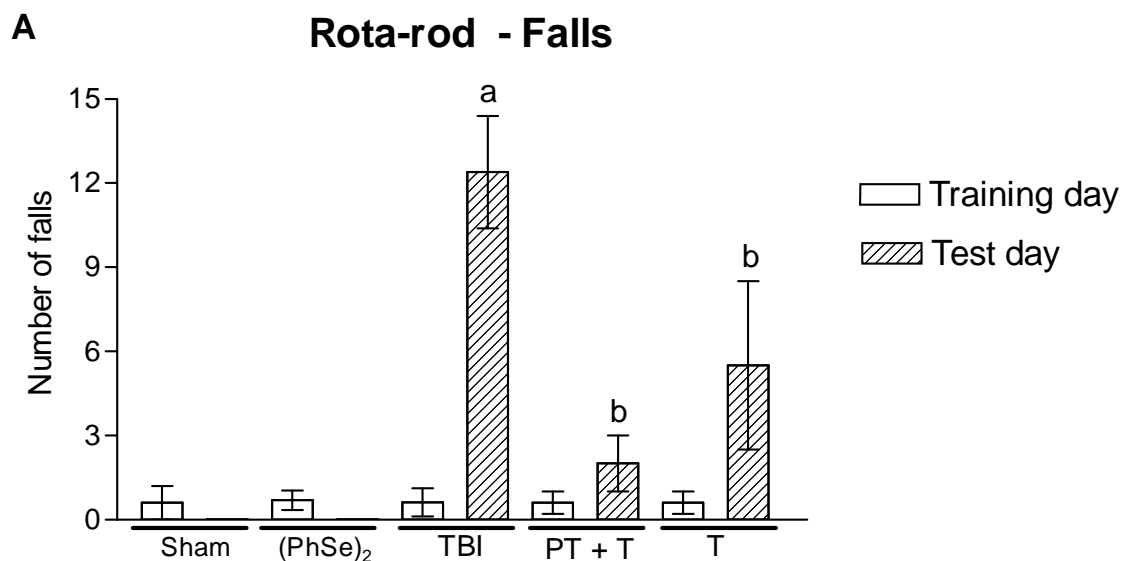


Figure 3 A. Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected or not to TBI on the number of falls from rota-rod task on training day and test day. Data are reported as means ± SEM of 10 rats. ^a Significantly different from sham and (PhSe)₂ groups. ^b Significantly different from TBI group, both with P<0,05 (one way ANOVA followed by Newman-keuls test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

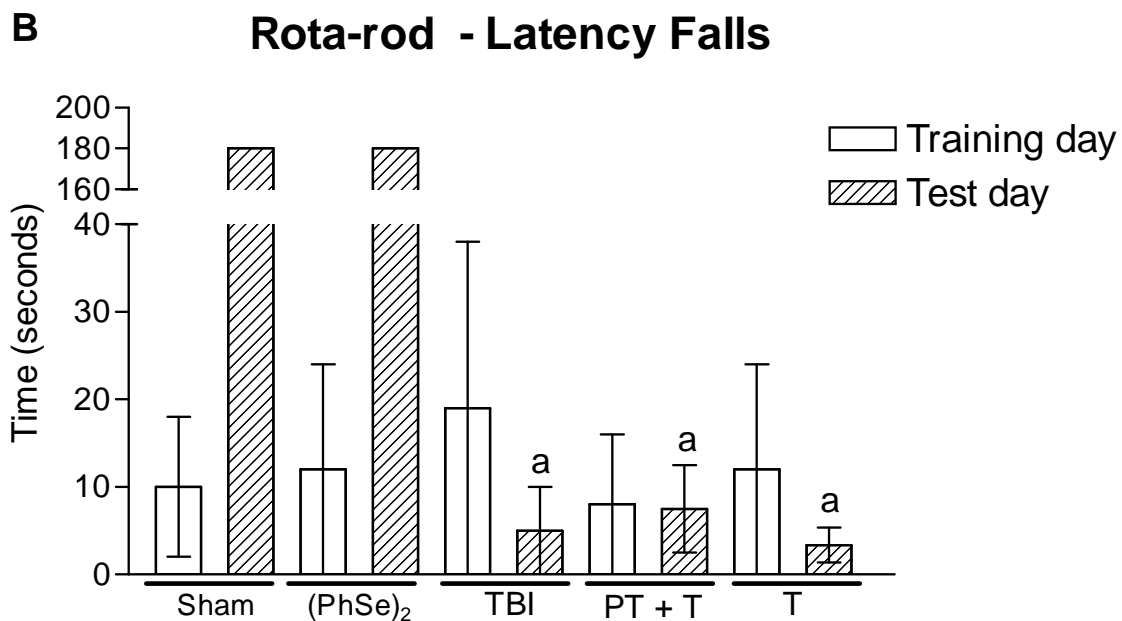


Figure 3 B. Effect of oral administration of (PhSe)₂ in animals subjected or not to TBI on latency falls from rota-rod task on training day and test day. Data are reported as means \pm SEM of 10 rats. ^a Significantly different from sham and (PhSe)₂ groups, with $P < 0,05$ (one way ANOVA followed by Newman-keuls test).

Sham – positive control; (PhSe)₂ - diphenyl diselenide; TBI – trauma brain injury; T – treatment; PT + T – pretreatment plus treatment.

4. Discussion

The data obtained in this study expresses a clear protective effect of (PhSe)₂ on locomotor system. Besides, it suggests an anxiolytic-like effect after TBI induction by model of animal experimentation applied, at administrated dose and via.

In fact, the exploratory activity decrease followed by the repeated exposure at the same environment is taken as a measure of retention. The results of the present experiment showed that repeated exposure at the open field caused a reduction of the total number of entries and rears of sham, (PhSe)₂ control, pretreatment and treatment groups, indicating habituation, in exception of TBI group. This effect was increased by (PhSe)₂ on animals subjected to TBI and some kind of treatment of (PhSe)₂ when compared with TBI only, suggesting that this compound improved retention in these animals, perhaps by its action on glutamatergic system, as already previously described (NOGUEIRA et al., 2004) or in other molecular targets.

The performance at open field and other behavioral paradigms has been proposed as a behavioral index of anxiety (HALL, 1934; PELLOW et al., 1985). Anxiety is generally inferred from measuring the propensity of animals to approach or avoid to enter on inner areas of the open field (BERLYNE, 1960). The total of square assessed by animals of treatment group was not different from those of the control animals, indicating that behavioral habituation observed in this group cannot be attributed to the degree of anxiety. Actually, if the TBI induction leads to some degree of anxiety on animals by destroying the neural tissue, it seems to had been abolished by (PhSe)₂. However, the (PhSe)₂ already showed in other researches the anxiolytic-like effect (GHISLENI et al., 2008). To evaluate the central crossing parameter, it was indeed possible to observe that all groups crossed the central area, in exception of the TBI group. This data reinforces the possibility of anxious behavior decrease, leading to the increase of locomotion behavior by animals. Furthermore, in association with anxiolytic-

like effect, the results still suggest a protective effect on locomotor activity forwarded by total area entries observed in pretreatment and treatment group. Curiously, the pretreatment group showed a completely different behavior when compared to another groups, once retention was not presented by the pretreatment group. Opposed to other groups, the animals pretreated increased the exploratory activity, possibly revealing a state of non-anxiety. This could have some correlation with loss of memory. However, previous researches by our group, which evaluated the memory status on TBI with $(\text{PhSe})_2$ administration, showed an ameliorate in acquisition and facilitation of memory (DATA NOT PUBLISHED). Therefore, it seems to us that this hypothesis could be discarded. In line with this, the treatment group do not presented any difference when compared to control groups, offering a similar evidence as the pretreatment group, of a neuroprotective effect on cerebral activities linked to locomotion. On the other hand, if TBI group is compared to others, there is an unequivocal and severe decrease in its exploratory activity caused by TBI, demonstrating the evident neuroprotection offered by $(\text{PhSe})_2$ to groups treated with this organoselenium compound after TBI induction.

When the rears were evaluated, it was possible to observe the retention in sham and $(\text{PhSe})_2$ control groups. However, the retention observed in another groups is extreme if compared to the control groups. It is probable that this behavior has some connection with induced encephalic injury intensity, when the $(\text{PhSe})_2$ was not able to counteract this situation. These appointments lead us to suppose the occurrence of some difficulty to animals after TBI in their performance in vertical exploration. Actually, the motor function is mediated by a complex system of neural networks originated in the cortex and terminating in skeletal muscle. The association cortex, sensorimotor cortex, subcortical nuclei, cerebellum, and brainstem, they all communicate with each other to send a signal through the spinal cord to coordinate the movement. On the neuronal level, vestibulomotor function is integrated and mediated by corticospinal neurons, nigrostriatal neurons, the nucleus accumbens, the basal ganglia, and the

thalamus. Brain injury-induced motor deficits, like the experimental model applied, are believed to be a result of a disruption in any or all parts of these pathways and the goal of any behavioral test should correlate the observed deficits with the severity of the experimentally induced damage (GUYTON & HALL, 2006; HAMM, 1990).

On the other hand, it is important to observe, as described by Fujimoto et al. (2004), that there are very few, if any, purely motor behavioral tasks. Deficits caused by TBI result from disruption of complex motor pathways and sensorimotor integration, and therefore most of the described tests are sensorimotor in nature. Thereafter, some results from locomotor task are hard and difficult to be completely explained.

In line with this, the major stationary behavior observed in TBI group corroborate with their low exploratory activity if compared to another groups, as well as with an apparently anxious-like behavior reinforced by the absence of central crossing, that perhaps could also be added to locomotor activity damage. Some works has been shown a direct association between loss tissue in brain areas, like hippocampal and cortex, with behavioral changes (SANTARELLI et al., 2003; DURMAN, 2004).

On the other hand, when the retention and the central crossing are evaluated in animals subjected to TBI and also received some treatment with (PhSe)₂, the findings were very different from those observed in TBI group. Actually, this is understood by clear improvement in locomotor and exploratory activities as well as the anxiolytic-like effect provided by (PhSe)₂ in this parameters.

In addition to anxiety-induced avoidance, it has long been recognized that the exploratory behavior directed toward a novel stimulus is modulated by the curiosity-induced approach. This process is determined by the sensitivity of organisms to the positive motivational incentive properties of the stimulus (ROWE et al., 1998; FILE, 1990; MONTGOMERY, 1953). Consequently, the groups which received some treatment with (PhSe)₂ were more sensitive to the positive incentive properties to

explore again after the stimuli of the open field arena when compared to the TBI group. These arguments raised above suggest that the behavioral habituation was only possible to be presented after TBI induction by treatment offered with $(\text{PhSe})_2$. Finally, it could be argued that animals treated with $(\text{PhSe})_2$ were more able to recall previous stimulus exposures. In addition, although it was not possible to observe statistic difference among pretreatment and treatment groups on stationary behavior and central crossing parameters, it seems there is a clear tendency to better response of pretreatment group against to TBI. Perhaps, this could be explained by gradual accumulation of $(\text{PhSe})_2$ on CNS tissue leading to a better protection.

The results obtained from rota-rod task corroborate with data found in open field and lead us to an evident neuroprotective effect of $(\text{PhSe})_2$ under the neurolocomotor system, once the pretreatment and treatment groups showed an expressively minor number of falls than TBI group, even though they did not reach the same performance of controls groups, i.e. sham and $(\text{PhSe})_2$ groups. However and in particular, the pretreatment group demonstrated a response almost equitable to the control groups. It could mean a high neuroprotection when an accumulation of $(\text{PhSe})_2$ is presented on tissue, even in a bit longer time before the injury. Perhaps, such as in pretreatment as treatment event, it could be imputable to apparent preservation of some biochemistry mechanisms present in neural physiology by $(\text{PhSe})_2$, with special prominence to antioxidant (de BEM et al., 2006; LUCHESE et al., 2006; LUCHESE et al., 2007), glutamate uptake activities (NOGUEIRA, 2004), as well as others more.

In conclusion, the $(\text{PhSe})_2$ pretreatment and treatment ameliorate the habituation and locomotor activity of rats subjected to TBI. These results could be associated with the $(\text{PhSe})_2$ properties took together with some involvement in biochemistry metabolism present in locomotor brain areas. Finally, these outcomes suggest that $(\text{PhSe})_2$ has a pharmacological therapeutic potential against TBI

consequences, like decrease of movements. Nevertheless it is need more attempts to clarify the exact involvement of (PhSe)₂ on neurolocomotor areas.

5. Reference

Barbosa, N.B.V.; Rocha, J.B.T.; Wondracek, D.C.; Perotoni, J.; Zeni, G.; Nogueira, C.W. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. *Chem-Biol. Interact.*, v.163, p.230-238, 2006.

Barbosa, N.B.V.; Rocha, J.B.T.; Soares, J.C.M.; Wondracek, D.C.; Gonçalves, J.F.; Schetinger, M.R.C.; Nogueira, C.W. Dietary diphenyl diselenide reduces the STZ-induced toxicity. *Food Chem. Toxicol.*, v.46(1), p.186-194, 2008.

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

De Bem, A.F.; Portella, R.L.; Perotoni, J.; Becker, E.; Bohrer, D.; Paixão M.W.; Nogueira, C.W.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T. Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. *Chemico-Biol. Interact.*, v. 162, p.1-10, 2006.

Durman R.S. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol. Psychiatry.*, v.156, p.140-145, 2004.

Favero, AM; Weis, SN; Zeni, G; Rocha, JBT; Nogueira, CW. Diphenyl diselenide changes behavior in female pups. *Neurotox. Teratol.*, v. 28, p.607-616, 2006.

Fujimoto, S.T.; Longhi, L.; Saatman, K.E.; McIntosh, T.K. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurososc. Behav. Rev.*, v.28, p.365-378, 2004.

Gaetz, M. The neurophysiology of brain injury. *Clin. Neurophysiol.*, v.115, p.4-8, 2004.

Ghisleni, G.C.; Porciúncula, L.O.; Cimarosti, H.; Rocha, J.B.T.; Salbego, C.G.; and Souza, D.O. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Res.*, v.986, p.196-199, 2003.

Ghisleni, G.; Kazlauskas, V.; Both, F.L.; Pagnussat, N.; Mioranza, S.; Rocha, J.B.; Souza, D.O.; Porciúncula, L.O. Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: Putative roles of GABAA and 5HT receptors. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, v.32(6), p.1508-1515, 2008.

Ghosh, A.; Carnahan, J.; and Greenberg, M.E. Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*, v.263, p.1618–1623, 1994.

Guyton, A.C. & Hall, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11th Ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. p.674-713.

Kraus, J.F. and Nourjah, P. The epidemiology of mind, uncomplicated brain injury. *J Trauma*, v.28, p.1637-1643, 1998.

Kibby, M.Y.; Long, C.J. Minor head injury: attempts at clarifying the confusion. *Brain Injury*, v.10, p.159-186, 1996.

Hamm R.J. Neurobehavioral assessment of outcome following traumatic brain injury in rats: an evaluation of selected measures. *J. Neurotrauma*, v.18 (11), p.1207-1216, 2001.

Hamm, T.M. Recurrent inhibition to and from motoneurons innervating the Flexus-Digitorum and Flexus-Hallucis-Longus muscle of the cat. *J. Neurophysiol.*, v.63(3), p.395-403, 1990.

Lei X.G.; Cheng W.H. New roles for an old selenoenzyme: evidence from glutathione peroxidase-1 null and overexpressing mice. *J. Nutr.*, v.135, p.2295-2298, 2005.

Liou, A.K.F.; Clark, R.S.; Henshall, D.C.; Ying, X-M.; Chen, J. To die or not to die in neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Progr. Neurobiol.*, v.69, p103-142, 2003.

Luchese C., Sthangerlin, E.C., Ardais, A.P., Nogueira, C.W., and Santos F.W. *Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups. Toxicology*, v.230, p.189-196, 2007.

Luchese, C.; Brandão R.; Oliveira, R.; Nogueira, C.W.; Santos, F.W. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol. Lett.*, v.173, p.181-190, 2007.

Margulies, S. The postconcussion syndrome after mild head trauma: is brain damage overdiagnosed? *J. Clin. Neurosci.*, v7, p.400-408, 2002.

Nogueira, C.W.; Rotta, L.N.; Perry, M.L.; Souza, D.O.; Rocha, J.B. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system "in vitro" and "In vivo". *Brain Res.*, v.906, p.157-163, 2001.

Paulmier C. Selenoorganic functional groups. Selenium reagents and intermediate in organic synthesis. *Pergamon Press*. 1st ed., Oxford: England, p. 25-51, 1986.

Pohl, D.; Bittgau, P.; Ishimaru, M.J.; Stadthaus, D.; Hübner, C.; Olney, J.W.; Turski, L. and Ikonomidou, C. N-Methyl-D-Aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Pharmacol.*, v.96(5), p.2508-2513, 1999.

Rosa, R.M.; Flores, D.G.; Appelt, H.R.; Braga, A.L.; Henriques, J.A.P. and Roesler, R. Facilitation of long-term object recognition memory by pretaining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci. Lett.*, v.341, p.217-220, 2003.

Rosa, R.M.; Roesler, R.; Braga, A.L.; Saffi, J.; Henriques, J.A. Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.40(10), p.1287-1304, 2007.

Santarelli, L.; Saxe, M; Gross, C. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science*, v.301, p.805-809, 2003.

Savegnago, L.; Trevisan, M.; Alves, D.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v.21, p.86-92, 2006.

Savegnago, L.; Pinto, L.G.; Jesse, C.R.; Alves, D.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: Evidences for the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.*, v.555, p.129-138, 2007.

Savegnago, L.; Jesse, C.R.; Pinto, L.G.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W.; Zeni, G. Monoaminergic agents modulate antidepressant-like effect caused by diphenyl diselenide in rats. *Progr. Neuro-Psychopharm. Biol. Psychiatry*, v.31, p.1261-1269, 2007.

Shaw, N. A. The neurophysiology of concussion. *Progr. Neurobiol.*, v.67, p.281-344, 2002.

Tabuchi, A.; Nakaoka R.; Amano K.; Yukimine M.; Andoh T.; Kuraishi Y.; Tsudai M. Differential Activation of Brain-derived Neurotrophic Factor Gene promoters I and III by Ca²⁺ Signals Evoked via L-type Voltage-dependent and N-Methyl-D-aspartate Receptor Ca²⁺ Channels. *J. Biol. Chem.*, v.275, p.17269-17275, 2000.

Tao X.; Finkbeiner S.; Arnold, D.B.; Shaywitz, A.J.; Greenberg, M.E. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron*, v. 20, p.709-726, 1998.

Zafra, F.; Castreñón, E.; Thoenen, H.; and Lindholm, D. Interplay between glutamate and gamma-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.88, p.10037–10041, 1991.

Zola-Morgan, S.M.; Squire, L.R. Neuroanatomy of memory. *Ann. Rev. Neurosci.*, v16, p.547-563.

4. DISCUSSÃO

Os traumas crânio-encefálicos são um problema de saúde pública que afetam mais de 10 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo co-responsáveis, dentre outras causas, por incrementar as taxas de morbidade e mortalidade globais (PUVANACHANDRA & HYDER, 2008). Não obstante, parece haver acordo de que as principais vítimas são, sobretudo, as crianças, onde as lesões secundárias e a pressão intracraniana concorrem para o óbito (GRINKEVICIUTE et al., 2008) ou para sérias e permanentes seqüelas de ordem funcional e psicológica, guardadas as proporções do trauma (FARIA et al., 2008).

Os traumas crânio-encefálicos, por sua vez, podem ter várias etiologias causais, contudo, no Brasil, a que mais se sobressai é decorrente de acidentes de trânsito. Tanto que, em 2004, 34,8% dos óbitos registrados, se reportam a este tipo de evento, onde sua deflagração está intimamente relacionada ao traumatismo crânio-encefálico grave (FREITAS, 2008). Nos Estados Unidos da América, estima-se que, anualmente, cerca de 1,1 milhão de pessoas tenham sofrido, em diferentes escalas, algum tipo de trauma crânio-encefálico (CDC, 2008; ARCINIEGAS et al., 2005). Em outro estudo, no mesmo país, revelou que à medida que os indivíduos envelhecem, há um crescente aumento nos registros de hospitalizações por trauma encefálico na população em geral. De fato, indivíduos entre 65 a 74 anos, a proporção encontrada foi de 104,6 vítimas para cada 100.000 habitantes, e para os indivíduos acima de 75 anos, esta proporção aumentou substancialmente para 287,3 (THOMPSON et al., 2006).

Apesar de o trauma crânio-encefálico ser um evento extremamente lesivo e debilitante para suas vítimas, atualmente não se dispõe de um composto capaz de, ao mesmo tempo, reunir em si a possibilidade de agir eficaz e pronunciadamente em

diferentes alvos moleculares, ou de algum que seja estratégico e de magnitude importantes, a fim de abrandar as conseqüências do trauma. O que se dispõe, na verdade, são associações estratégicas de classes farmacológicas para minimizar os eventos desencadeados pelas lesões secundárias do trauma, tais como antiinflamatórios, antimicrobianos, fármacos diuréticos e vasoativos, antioxidantes, analgésicos e psicofármacos. Ademais, ainda se busca experimentalmente algumas possibilidades, entretanto, apesar de não estarmos totalmente inermes, podemos assumir uma condição farmacoterapêutica fragilmente robustecida frente à realidade do trauma (BEAUCHAMP et al., 2008; PACHALSKA et al., 2008; STOCCHETTI et al., 2008; CHEN et al., 2008; XIAO et al., 2008).

Dentro deste contexto, vários estudos vêm apontando para alguns compostos orgânicos à base de selênio, dentre os quais está o ebselem, o qual tem demonstrado apresentar propriedades interessantes, tais como antioxidante (SIES & MOSS, 1978; BRIVIBA et al., 1996; KLOTZ et al., 2003; SIES, STAHL & SEVANI, 2005), anti-isquêmica (YAMAGUCHI et al., 1998), antiinflamatória (LEE et al., 2007), antimicrobiana (MICHALEK et al., 2008), dentre outras.

E, a partir do ebselem, se chegou a outro composto, o disseleneto de difenila, que goza de algumas características e propriedades químicas e farmacológicas semelhantes ao ebselem, como antioxidante (WILSON et al., 1989; NOGUEIRA et al., 2004) e antiinflamatória (NOGUEIRA et al., 2003). Todavia, apresenta, ainda, várias outras propriedades, tais como: ação antinociceptiva (SHIMOHASHI et al., 2000; ZASSO et al., 2005), hepatoprotetora (BORGES et al., 2006), ansiolítica (GHISLENI et al., 2008), melhora da aquisição e retenção de memória espacial em ratos (STANGERLIN et al., 2008), ação neuroprotetora contra toxicidade provocada por peróxido de hidrogênio (POSSER et al., 2008), dentre outras. Entretanto, até o momento, as propriedades do disseleneto de difenila não haviam sido testadas frente ao trauma crânio-encefálico. E, como há uma extensa gama de eventos que envolvem

o trauma, bem como de tipos de trauma, escolhemos um modelo de trauma mecano-encefálico para testar os possíveis efeitos neuroprotetores do (PhSe)₂ sob esta condição.

Para alcançar o primeiro objetivo proposto, foi testado o efeito do (PhSe)₂ sobre a captação de ⁴⁵Ca⁺² em fatias de córtex, estriado e hipocampo de ratos após a indução de trauma mecano-encefálico. O cálcio é um elemento presente em uma série de eventos celulares, e que está diretamente relacionado ao processo de lesão neural via receptores glutamatérgicos NMDA. O aumento do cálcio citosólico desencadeia, por conseguinte, a uma série de eventos lesivos, onde se cita a ativação de proteases, fosfolipases, endonucleases, a geração de radicais livres e a inibição de ATPases (BERRIDGE, 1993; BERRIDGE & BOOTMAN, 1998; KRAUS & NOURJAH, 1998; BERRIDGE, LIPP & BOOTMAN, 2000; FLOREA et al., 2005) . Adicionalmente, foi dosado Mg⁺² livre no soro dos mesmos animais, já que este íon tem demonstrado ser relevante para manter a homeostasia do tecido nervoso, tanto como co-fator enzimático em enzimas bioenergéticas, e como íon regulador de receptores NMDA (HEALTH & VINK, 1996; CERNAK et al., 2000; SAATMAN et al., 2001; VINK et al., 2003).

Os resultados obtidos, apresentados no MANUSCRITO I, demonstraram que os animais submetidos ao trauma mecano-encefálico e a algum tratamento com (PhSe)₂, melhoraram a captação de ⁴⁵Ca⁺² em fatias de córtex, estriado e hipocampo, de forma especial os animais que receberam o pré-tratamento. Todavia, os animais que foram submetidos somente ao trauma parecem ter perdido a capacidade de modulação de transporte deste íon, o que nos presume lesão celular.

Talvez haja uma relação direta do (PhSe)₂ na manutenção da integridade membranar e na diminuição do nível de estresse oxidativo, uma vez que o composto já demonstrou ser capaz de aumentar a recaptação de glutamato por células nervosas

(NOGUEIRA et al., 2001^o) e possuir ação mimética da GPx (WILSON et al., 1989; NOGUEIRA et al., 2004), propriedades estas que concorreriam, respectivamente, à diminuição do influxo celular de cálcio e do dano oxidativo envolvidos neste tipo de lesão.

Em relação aos resultados da dosagem sérica de magnésio é possível sugerir uma atividade moduladora do (PhSe)₂ sobre os níveis de magnésio. Esta atividade cooperou para prevenir maiores danos pós-traumáticos nas células dos tecidos envolvidos, muito provavelmente pela modulação do transporte de potássio e cálcio celulares e da estabilidade de membrana celular oferecida pelo magnésio (HEALTH & VINK, 1996; FROMM et al., 2004), e até mesmo pelas suas propriedades antiinflamatórias devido à sua atividade inibitória sobre HSP-70, ciclooxygenase 2 e neurotrofinas (BURTON et al., 2003). De forma diametralmente oposta, os níveis de magnésio encontraram-se diminuídos nos animais submetidos unicamente ao trauma, acompanhando os resultados encontrados nas dosagens de ⁴⁵Ca⁺² nas fatias de córtex, estriado e hipocampo.

Para avaliar a facilitação de memória de longa duração e aquisição de memória, foram utilizados, respectivamente, os testes comportamentais do medo condicionado e da alternância espontânea (Y-maze), os quais encontram-se descritos no MANUSCRITO II. Todavia, antes de se proceder com teste do medo condicionado, foi realizado também o teste de sensibilidade auditiva (startle test) com o intuito de verificar a viabilidade de execução do referido teste, já que é imperioso que os animais estejam aptos para perceber o estímulo sonoro envolvido.

No teste do medo condicionado foram avaliados o tempo de latência para o início de movimentos em relação ao estímulo sonoro acionado, o número de micções e o número de defecações dos animais. Ao se avaliar o tempo de latência, apesar de não haver diferença estatística significativa entre os grupos TBI (somente trauma

mecano-encefálico) e grupos tratados – pré-tratamento e tratamento – se for levada em consideração a média entre estes mesmos grupos, é possível de se verificar uma tendência do grupo pré-tratado em projetar uma resposta em direção aos grupos controles, aqui chamados de Sham e controle de $(\text{PhSe})_2$. Contudo, ao se avaliar o número de micções e defecações realizados pelos grupos TBI, pré-tratamento e tratamento, comparados aos grupos controles, fica evidente a interferência do $(\text{PhSe})_2$ nos grupos tratados em relação ao grupo TBI. Neste último, estes dois parâmetros estão marcadamente menores que nos outros grupos.

Somado a estas avaliações, as que foram realizadas utilizando o teste de alternância espontânea demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos TBI, pré-tratamento e tratamento quando analisado o número de entradas nos braços do aparato, sendo estes resultados bem diferentes dos encontrados nos grupos controle.

Todavia, ao se avaliar a deambulação dos animais no labirinto proposto, se observadas as médias entre os grupos, há uma clara tendência de melhora nas respostas dos grupos pré-tratamento e tratamento – de modo especial o primeiro - quando comparados tanto ao grupo TBI quanto aos grupos controles. Contudo, os resultados encontrados na avaliação do parâmetro “número de erros nas alternações”, fica muito evidente o envolvimento do $(\text{PhSe})_2$ em reduzir o número de erros e, por consequência, a melhora na aquisição de memória dos animais submetidos ao pré-tratamento e tratamento, novamente, de forma mais pronunciada no pré-tratamento.

Por outro lado, é bem aceito que para a formação de memória de longa duração é necessária a participação de mecanismos de transcrição e translação em várias áreas seletivas do sistema nervoso (DAVIS & SQUIRE, 1984; YIN & TULLY, 1996; IZQUIERDO & MEDINA, 1997; IMPEY et al., 1998; SILVA et al., 1998), onde o hipocampo tem participação tanto na aquisição quanto na consolidação de memória,

valendo-se de mecanismos de síntese protéica, intermediados por mecanismos biossinalizadores, onde estão presentes CREB e BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), os qual sofre regulação de proteínas cálcio-dependentes (TAO et al., 1998; TABUSHI et al., 2000; ROSSATO et al., 2007; CAMMAROTA et al., 2007; BEKINSCHTEIN et al., 2008; SILVA et al., 2008).

Algumas pesquisas sobre o $(\text{PhSe})_2$ têm sugerido que o composto melhorou a facilitação de memória de longa duração em camundongos (ROSA et al., 2003) e, adicionalmente, foi capaz de estimular a enzima adenilato ciclase e a via biossinalizadora MAPK, que são importantes vias metabólicas envolvidas na aquisição e facilitação de memória (NOGUEIRA et al., 2001; STAPLETON et al., 1997). De fato, quando essas vias acima citadas são estimuladas, a aquisição ou facilitação de memória são favorecidas. No entanto, quando as mesmas vias sofrem inibição, a capacidade de aquisição ou facilitação fica prejudicada (BACH et al., 1999; ATKINS et al., 1998; ORBAN, CHAPMAN, BRAMBILLA, 1999; WALZ et al., 2000^a; WALZ et al., 1999^b; BEVILAQUA et al., 2007). Sendo assim, é plausível sugerir que os resultados encontrados no modelo de trauma e os testes para avaliação de memória utilizados pressupõem a interferência positiva do $(\text{PhSe})_2$ sobre a aquisição e facilitação de memória.

No MANUSCRITO III foi avaliado o efeito neuroprotetor do $(\text{PhSe})_2$ sobre o aparelho neurolocomotor através dos testes de campo aberto e “rota-rod”. No campo aberto foi avaliada a capacidade exploratória através da mensuração do número de áreas percorrido, a exploração vertical, comportamento estacionário e os cruzamentos centrais no labirinto. No rota-rod foram observadas o número de quedas e tempo de latência para as quedas.

No teste de campo aberto, a diminuição da atividade exploratória, seguida de exposições repetidas em um mesmo ambiente é considerada como medida de

retenção. Os resultados obtidos no experimento demonstraram uma redução do número total de áreas percorridas, de atividade exploratória vertical e de cruzamentos centrais nos grupos estudados, o que poderia ser considerado como habituação. Todavia, o comportamento se mostra diferente, em níveis ou graus variados entre os grupos. De fato, parece que o trauma interfere na retenção, de forma a potencializá-la e, com isso, diminui a atividade exploratória do grupo TBI e aumenta o comportamento estacionário.

Muito embora os grupos pré-tratado e tratado também tenham sofrido trauma mecano-encefálico, a administração oral de $(\text{PhSe})_2$ nestes grupos parece ter melhorado sua capacidade exploratória, levando-se em consideração o trauma sofrido. Este comportamento se faz presente em todos os parâmetros avaliados neste teste, com exceção da exploração vertical. Por outro lado, o grupo pré-tratado percorreu um número maior de áreas do labirinto, superior até mesmo dos grupos controles.

Esses efeitos do $(\text{PhSe})_2$ sobre o sistema neurolocomotor muito provavelmente sejam um somatório das ações já descritas por pesquisas anteriores, sem, é claro, descartar a possibilidade de novos alvos moleculares.

Além do aspecto locomotor, os parâmetros de exploração do teste de campo aberto vêm sendo propostos como uma forma de avaliação de ansiedade (PELLOW et al., 1985; STANSFIELD & KIRSTEIN, 2007; SOLÍS et al., 2008; WIKLUND et al., 2008). A ansiedade geralmente é inferida a partir da propensão dos animais em explorarem ou evitarem a exploração percorrendo ou não as áreas do labirinto do campo aberto (WAGNER et al., 2007; SCHULZ et al., 2007; SCHRAM-SAPYTA et al., 2008; CHRISTOFFERSEN et al., 2008). O número total de quadrados percorridos pelos animais do grupo pré-tratado foi maior que os grupos tratado e controles, tendo estes últimos revelado um comportamento de habituação. Estes resultados sugerem um possível efeito neuroprotetor do $(\text{PhSe})_2$ sobre as estruturas nervosas que

coordenam a atividade neurolocomotora, uma vez que o grupo TBI apresentou um comportamento diametralmente oposto aos outros grupos, ou seja, com visível prejuízo da atividade exploratória. Por outro lado, é possível que estes resultados também possam ser ajudados pelo efeito ansiolítico $(\text{PhSe})_2$ sabidamente presente (GHISLENI et al., 2008), facilitando com que os animais possam desenvolver uma melhor exploração do ambiente.

Curiosamente o grupo pré-tratado percorreu um número de áreas superior a todos os grupos, nem mesmo apresentando retenção, mas aumentando sua atividade exploratória em relação aos outros grupos, o que talvez possa ser atribuído a um estado de não ansiedade.

Em virtude da presente lesão provocada pelo trauma, poderia se pensar em justificar essa atividade pela perda de memória. No entanto, os estudos de avaliação de aquisição e facilitação de memória, anteriormente comentados, fazem com que rejeitemos esta hipótese.

Ainda de acordo com estes achados, o grupo tratado não apresentou diferença quando comparado aos grupos controles, oferecendo, assim, maior evidência ao efeito neuroprotetor do $(\text{PhSe})_2$ às áreas cerebrais que coordenam a locomoção. Por outro lado, ao se comparar o grupo TBI com os outros grupos, há uma inequívoca e severa diminuição da atividade exploratória provocada pelo trauma, o que vem reforçar a neuroproteção proporcionada pelo $(\text{PhSe})_2$.

Quando a exploração vertical foi avaliada, foi possível observar uma retenção extremada nos grupos TBI, pré-tratado e tratado, quando comparados aos grupos controles. Estes achados supõem uma dificuldade no desempenho da exploração vertical dos animais submetidos ao trauma.

Sabe-se que a função motora é mediada por um sistema complexo de redes neurais que se estendem desde os córtices até a junção neuromuscular. As lesões

cerebrais são potencialmente causadoras de danos motores pela disrupção das vias neurais que controlam o movimento, e é dependente da intensidade do trauma e das lesões (HAMM, 1990; VANDER et al., 2001).

Por outro lado, é interessante levar em consideração o que Fujimoto e colaboradores (2004) descreveram a respeito de testes comportamentais para avaliação motora, ou seja, os testes que se dispõem para avaliar a capacidade motora ou sensoriomotora não são testes puros e capazes de esgotar os diversos aspectos que estão presentes neste tipo de avaliação. Tornando, assim, muitas vezes difícil de conseguir explicar de forma satisfatória e abrangente todos os resultados encontrados nesses testes.

Ainda dentro das avaliações da atividade motora através do teste de campo aberto, os resultados relacionados ao comportamento estacionário revelaram que o grupo TBI apresentou o maior tempo sem manifestar movimentos e, conseqüentemente, a menor atividade exploratória, com um aparente comportamento ansioso, reforçado pela ausência de cruzamentos centrais, o que parece ter uma relação direta ao trauma induzido. Neste sentido, alguns trabalhos têm demonstrado uma associação direta entre a perda tecidual de áreas cerebrais, tais como hipocampo e córtex, que acabam por traduzir em mudanças e prejuízos comportamentais (SANTARELLI et al., 2003; DURMAN, 2004; CHANNEY & MANJI, 2004).

Por outro lado, quando a retenção e os cruzamentos centrais são avaliados nos grupos submetidos ao trauma e que recebem algum tratamento com o $(\text{PhSe})_2$ os achados foram muito diferentes dos observados no grupo TBI, ou seja, demonstraram um aumento das atividades locomotora e exploratória, bem como de um aparente efeito ansiolítico proporcionado pelo $(\text{PhSe})_2$.

Adicionalmente, é bem estabelecido que o comportamento exploratório tem uma relação direta a novos estímulos, os quais são modulados por curiosidade

motivacional. Esta por sua vez é determinada ou influenciada por aspectos emocionais, como a ansiedade ou sua ausência, onde maior ansiedade concorre para uma menor atividade exploratória (MONTGOMERY, 1953 FILE, 1990; ROWE et al., 1998). Neste sentido, foi possível perceber que os grupos que receberam algum tratamento com $(\text{PhSe})_2$, mesmo tendo sido submetidos ao trauma, se mostraram positivamente mais propensos à exploração do ambiente da arena do campo aberto quando comparados ao grupo TBI.

Finalmente, pode-se ainda sugerir que os grupos tratados com $(\text{PhSe})_2$ foram mais hábeis em evocar estímulos de exposições prévias. E, muito embora não tenha sido observado diferença estatística significativa entre os grupos tratado e pré-tratado nos cruzamentos centrais e comportamento estacionário, parece haver uma tendência do grupo pré-tratado em responder melhor à agressão tecidual induzida pelo trauma. Talvez isto possa ser explicado por um possível acúmulo gradual de $(\text{PhSe})_2$ no SNC, o que parece corresponder a uma melhor proteção contra o trauma induzido.

Os resultados obtidos do teste rota-rod corroboram com os achados no teste de campo aberto nos sugerem um efeito neuroprotetor do $(\text{PhSe})_2$ para o sistema neurolocomotor, uma vez que os grupos pré-tratado e tratado demonstraram um número de quedas expressivamente menor quando comparados ao grupo TBI, muito embora não tenham atingido a mesma performance dos grupos controles, sham e $(\text{PhSe})_2$. Entretanto, e de forma singular, o grupo pré-tratado obteve uma resposta quase eqüitativa aos grupos controles.

Neste sentido, parece que a neuroproteção encontra-se aumentada quando foi administrado $(\text{PhSe})_2$ por um período de tempo maior, que precedeu à injúria tecidual. É bem possível que os grupos que receberam pré-tratamento e tratamento com $(\text{PhSe})_2$ sejam capazes de imputar uma aparente preservação dos mecanismos bioquímicos presentes na fisiologia nervosa, de forma proeminente à ação

antioxidante (de BEM et al., 2006; LUCHESE et al., 2006; LUCHESE et al., 2007), à recaptação celular de glutamato (NOGUEIRA, 2004), à recaptação de cálcio e a preservação dos níveis de magnésio (DADOS NÃO PUBLICADOS), os quais cooperam para preservar as vias metabólicas que regulam as atividades neurais e, por consequência, melhoram a aquisição e facilitação de memória, bem como a atividade neurolocomotora após indução de trauma mecano-encefálico no modelo animal e protocolos de investigação adotados, e com a concentração de $(\text{PhSe})_2$ e via utilizados.

5. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados nesta tese, levando-se em consideração o modelo de trauma e de animais adotados, bem como os protocolos experimentais elegidos e realizados, é possível inferirmos que:

- I. O protocolo de indução de trauma mecano-encefálico realizado foi capaz de ser reprodutível e eficaz na geração de dano tecidual;
- II. Os grupos pré-tratado e tratado com $(\text{PhSe})_2$ melhoraram a captação de cálcio membranar em fatias de córtex, estriado e hipocampo após indução de trauma mecano-encefálico, observando-se uma melhor recaptação no grupo pré-tratado;
- III. A administração oral de $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de preservar parcialmente as concentrações séricas de magnésio após indução de trauma mecano-encefálico, no caso do grupo tratado, e promoveu uma discreta elevação nos níveis séricos deste eletrólito, no caso do pré-tratamento;
- IV. A administração oral de $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de melhorar a aquisição e facilitação de memória nos testes realizados após indução de trauma mecano-encefálico, observando-se, na maioria dos parâmetros avaliados, resultados pronunciadamente melhores para o grupo pré-tratado;
- V. A administração oral de $(\text{PhSe})_2$ foi capaz de melhorar a atividade neurolocomotora após indução de trauma mecano-encefálico nos testes realizados, observando-se, na maioria dos parâmetros avaliados, resultados pronunciadamente melhores para o grupo pré-tratado;
- VI. A possível bioacumulação de $(\text{PhSe})_2$ no tecido nervoso, pela via de administração utilizada, conduziu a uma melhora dos resultados após indução de trauma mecano-encefálico nos estudos realizados nesta tese.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Levando-se em consideração os resultados promissores do (PhSe)₂ frente à indução de trauma mecano-encefálico em ratos presentes nesta tese, poderiam ser realizados outros estudos de forma a elucidar ou propor elucidação dos mecanismos pelos quais o (PhSe)₂ foi capaz de, aparentemente, reduzir o dano tecidual, de melhorar a aquisição e facilitação de memória, bem como da atividade neurolocomotora dos animais. Outro aspecto que poderia ser melhor estudado é a farmacocinética do composto, de modo especial, estudo de sua biodisponibilidade após a administração oral. Sendo assim, para se chegar a resultados que consigam responder a essas propostas, poderiam ser lançados os seguintes objetivos:

- I. Avaliar a expressão de enzimas, proteínas e fatores nucleares envolvidos nos mecanismos moleculares de lesão e apoptose, tais como iNOS, NFkB, TNF- α , Caspase 3 e p53 em homogeneizados de cérebro de ratos submetidos a trauma mecano-encefálico e tratados com (PhSe)₂, bem como de seus respectivos controles;
- II. Avaliar a micromorfologia de cérebro de ratos submetidos a trauma mecano-encefálico e tratados com (PhSe)₂, bem como de seus respectivos controles;
- III. Avaliar a interferência do (PhSe)₂ sobre moléculas envolvidas nos mecanismos já descritos para aquisição de memória, tais como BDNF, proteínas e enzimas mitogênicas, bem como dos neurotransmissores dopamina, glutamato, acetilcolina e GABA;
- IV. Avaliar a interferência do (PhSe)₂ sobre neurotransmissores envolvidos nos mecanismos já descritos para a atividade neurolocomotora, de modo especial o sistema glutamatérgico, dopaminérgico e gabaérgico nos núcleos da base, tálamo e córtices pré-motor e motor;

- V. Avaliar parâmetros farmacocinéticos, tais como absorção, biodisponibilidade, volume de distribuição, biotransformação e excreção do $(\text{PhSe})_2$ a partir da administração oral;
- VI. Estudar a organogênese e mutagênese frente à administração de $(\text{PhSe})_2$.

7. REFERÊNCIAS

- Afifi, A.K. **Basal ganglia: functional anatomy and physiology.** Part 1. J. Child. Neurol., v.9(3), p. 249-260, 1994.
- Alonso, M., Bekinschtein, P., Cammarota, M., Vianna, M.R.M. et al. **Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex.** *Article and publication are at <http://www.learnmem.org/cfl/doi/10.1101/lm.27305>.* Acesso em: 22 de out. de 2008.
- Altura, B.M., Gebrewold, A., Zhang, A. et al. **Low extracellular magnesium ions induces lipid peroxidation and activation of nuclear factor-kappa B in canine cerebral vascular smooth muscle: possible relation to traumatic brain injury and strokes.** Neurosci. Lett., v.341, p.189-192, 2003.
- Arciniegas, D.; Adler, L.; Topkoff, J. et al. **Attention and memory dysfunction after traumatic brain injury: Cholinergic mechanism, sensory ating, and a hypothesis for further investigation.** Brain Inj., v.13, p.1-13, 1999.
- Atkins, C.M.; Selcher, J.C.; Petraitis, J.J. et al. **The MAPK cascade is required for mammalian associative learning.** Nar. Neurosci., v.1, p602-609, 1998.
- Bach, M.E.; Barad, M.; Son, H. et al. **Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.96, p.5380-5285, 1999.

- Bailey, C.H., Bartsch, D., Kandel, E.R. **Toward a molecular definition of long-term memory storage.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.93, p.1345-1352, 1996.
- Beachamp, K.; Mutlak, H.; Smith, W.R. **Pharmacology of traumatic brain injury: where is the “golden bullet”?** Mol. Med., v.14(11-12), p. 731-740.
- Bekinschtein, P.; Cammarota, M.; Katche, C. et al. **BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.105(7), p.2711-2712, 2008.
- Bernabeu, R.; Bevilaqua, L.; Ardenghi, P. et al. **Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.94, p.7041-7046, 1997.
- Berridge, M.J. **Inositol triphosphate and calcium signaling.** Nature, v.361, p.315-325, 1993.
- Berridge, M.J. & Blotman, M.D. **Calcium – a life and death signal.** Nature, v.395(6703), p.645-648, 1998.
- Berridge, M.J.; Lipp, P. & Bootman, M.D. **The versatility and universality of calcium signaling.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol., v.280(1953), p.203, 2000.
- Bevilaqua, L.R.M.; Rossato, J.I.; Bonini, J.S. et al. **The role of the entorhinal cortex in extinction: influences of aging.** Neur. Plast., 2008, ID 595282, p.1-8, 2008.

- Bevilaqua, L.R.; Rossato, J.I.; Clarke, J.H.; et al. **Inhibition of c-Jun N-terminal kinase in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks extinction of inhibitory avoidance memory.** *Behav. Pharmacol.*, v.18(5-6), p.483-489, 2007.
- Bjornstedt, M.; Odlander, B.; Kuprin, S.; Claesson, H. E. **Selenite incubated with NADPH and mammalian thioredoxin reductase yields selenide, which inhibits lipoxygenase and changes the electron spin resonance spectrum of the active site iron.** *Biochemistry*, v.35, p.8511-8516, 1996.
- Borges, V.C.; Rocha, J.B.T.; Nogueira, C.W. **Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats.** *Toxicology*, v.215, p.191-197, 2005.
- Borges, L.P.; Borges, V.C.; Moro, A.V. et al. **Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats.** *Toxicology*, v.210, p.1–8, 2005.
- Braga, A.L.; Zeni, G.; Andrade, L.H.; Silveira, C.C. **Stereoconservative formation and reactivity of d-chalcogenfunctionalized vinylithium compounds from bromo-vinilyc chalcogens.** *Synlett*, v.5, p.595-596, 1997.
- Brinton, R.D.; Thompson, R.F.; Foy, M.R. et al. **Progesterone receptors: Form and function in brain.** *Front. Neuroend.*, v.29(2), p.313-339, 2008.
- Briviba, K.; Roussyn, I.; Sharov, V.S. et al. **Attenuation of oxidation and nitration reactions of peroxynitrite by selenomethionine, selenocystine and ebselen.** *Biochem. J.*, v.319, p.13-15, 1996.

- Brodsky, S.V. & Gealekman, O. **Prevention and reversal of premature endothelial cell senescence and vasculopathy in obesity-induced diabetes by ebselen**. Circ. Res., v.94, p.377, 2004.
- Burton, A.W.; Mendel, E. **Vertebroplasty and kyphoplasty**. Pain Physician., v.6(3), p.335-341, 2003.
- Cammarota, M.; Bevilaqua, L.R.M.; Vianna, M.R.M. et al. **The extinction of conditioned fear: structural and molecular basis and therapeutic use**. Rev. Bras. Psiquiatr. [online]. 2007, v.29, n.1 [cited 2008-11-29], p.80-85. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-44462007000100019&lng=en&nrm=iso>. ISSN 1516-4446.
- CDC. Central for Disease Control and Prevention. **Traumatic Brain Injury**. Available from: <http://www.cdc.gov/ncipc/tbi/TBI.htm>. Acesso em: 01 de novembro de 2008.
- Cenark, I.; Savic, V.J.; Kotur, J. et al. **Characterization of plasma magnesium concentration and oxidative stress following graded traumatic brain injury in humans**. J. Neurot., v.17, p.53-68, 2000.
- Charney D.S.; Manji, M.K. **Life stress, genes and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention**. Sci. STKE, v.255, p.1-5, 2004.
- Chen, L.J.; Cui, L.Y.; Xing, L. et al. Prediction of the nutrient content in dairy manure using artificial neural network modeling. J. Dairy Sci., v.91(12), p.4822-4829, 2008.

- Choi, D.W. Glutamate **neurotoxicity and diseases of the nervous system**.
Neuron, v.1, p.623-634, 1998.
- Christison, J.; Sies, H.; Stocker, R. **Human blood cells support the reduction of low-density-lipoprotein-associated cholesteryl ester hydroperoxides by albumin-bound ebselen**. Biochem J, v.304(2), p.341-345, 1994.
- Christoffersen, G.R.; Simonyi, A.; Schachtman, T.T. et al. **MGlu5 antagonism impairs exploration and memory of spatial and non-spatial stimuli in rats**. Behav. Brain Res., v.191(2), p.235-245, 2008.
- Crutcher, M.D. & DeLong, M.R. **Single cell studies of the primate putamen**.
Exp. Brain Res., v.53, p.244-258, 1984.
- Davis, R.J. **Signal transduction of JNK group of MAP kinase**. Cell, v.103, p.239-252, 1984.
- Dawson, D.A.; Masayasu, H.; Graham et al. **The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat**. Neurosci. Lett., v.185, p.65-69, 1995.
- De Bem, A.F.; Portella, R.L.; Perottoni, J. et al. **Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods**. Chemico-Biol. Interact., v.162, p.1-10, 2006.
- DeLong, M.R. **Primate models of movement disorders of basal ganglia origin**. Trends Neurosci., v.13(7), p.281-285, 1990.

DENATRAN. Vítimas de acidentes de trânsito. Disponível em: WWW.2.cidades.gov.br/renaest/detalheNoticia.do?noticia..codigo=245. Acesso em 23 de agosto de 2006.

Dumont, E., Vanhaecke, F., Cornelis, R. **Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review**. Anal. Bioanal. Chem., v. 385, p.1304 – 1343, 2006.

Durman R.S. **Depression: a case of neuronal life and death?** Biol. Psychi., v.156, p.140-145, 2004.

Eichenbaum, H. **Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory**. Neuron, v.44(1), p.109-120, 2004.

Eustache, F., Desgranges, B., Petit-Taboué, M-C. et al. **Transient global amnésia: implicit/explicit memory dissociation and PET assessment of brain perfusion and oxygen metabolism in the acute stage**. J. Neurol. Neurosurg. and Psych., v.63, p.357-367, 1997.

Faria, J.W.; Nishioka, S.A.; Arbex, G.L. et al. **Occurrence of severe and moderate traumatic brain injury in patients attended in a Brazilian Teaching Hospital: epidemiology and dosage of alcoholemy**. Arq. Neuropsiquiatr., v.66(1), p.69-73, 2008.

File, E.S. **Intereactions of anxiolytic and antidepressant drugs with hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis**. Pharmacol. Ther., v.46, p.357-375, 1990.

- Flohé, L., Gunzler, W. A., and Schock, H. H. **Glutathione peroxidase- a selenoenzyme**. Febs Lett. v.32, p.132–134, 1973.
- Florea A.M.; Splettstoesser, F.; Dopp, E. et al. **Modulation of intracellular calcium homeostasis by trimethyltin chloride in human tumour cells: Neuroblastoma SY5Y and cervix adenocarcinoma HeLa S**. Toxicology, v.216, p.1-8, 2005.
- Freire, E. **Sistema Nervoso Central**. In: Trauma: A Doença dos Séculos. Ed Atheneu: São Paulo, p.136-138, 2001.
- Freitas, E.A.; Mendes, I.D.; Oliveira, L.C. **Alcohol consumption among victims of external causes in a university general hospital**. Rev. S. Pub., v.42(5), p.813-821, 2008.
- Fromm, L.; Health, D.L.; Vink, R. et al. **Magnesium attenuates post-traumatic depression/anxiety following diffuse traumatic brain injury in rats**. J. Am. Coll. Nutr., v.23(5), p.529-433, 2004.
- Fujimoto, S.T.; Longhi, L.; Saatman, K.E. et al. **Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury**. Neurosci. Behav. Rev., v.28, p.365-378, 2004.
- Gabrieli^a, J.D.E., Fleischman, D.A., Keane, M.M. **Double dissociation between memory systems underlying explicit and implicit memory in the human brain**. Psychol. Sci., v.6, p. 76-82, 1995.
- Gabrieli^b, J.D.E., Poldrack, R.A., Desmond, J.E. **The role of left prefrontal cortex in language and memory**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.95, p.906-913, 1998.

- Gaetz, M. **The neurophysiology of brain injury**. Clin. Neurophys., v.115, p.4-18, 2004.
- Ge, K.; Xue, A.; Bai, J.; Wang, S. **Kehsan disease: an endemic cardiomyopathy in China**. Virchows Arch Pathol. Anat., v. 401, p.1-15, 1983.
- Ghisleni, G.; Kazlauckas, V.; Both, F.L. **Diphenyl diselenide exerts anxiolytic-like effect in Wistar rats: Putative roles of GABAA and 5HT receptors**. Prog. Neuropsych Biol. Psychi., [Epub ahead of print], 2008.
- Ghisleni, G.; Porciuncula, L.O.; Cimarosti, H. et al. **Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent**. Brain Res., v.986, p.196-199, 2003.
- Gozlan, H. & Bem-Ari, Y. **NMDA receptor redox sites: are they targets for selective neuronal protection?** TiPS, v.16, p.368-375, 1995.
- Grilli, M. & Memo, M. **Nuclear factor kB/proteins**. Biochem. Pharmacol., v.57, p.1-7, 1999.
- Grinkeviciute, D.E.; Kevalas, R.; Matukevicius, A. et al. **Significance of intracranial pressure and cerebral perfusion pressure in severe pediatric traumatic brain injury**. Medicina (Kaunas), v.44(2), p.119-125, 2008.
- Gupta, N. and Porter, T. D. **Inhibition of human squalene monooxygenase by selenium compounds**. J. Biochem. Mol. Toxicol., v.16, p.18-23, 2001.

- Guyton, A. C.; Hall, J. E. **Textbook of Medical Physiology**, 11 ed., Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. 555-597p.
- Ham, J.; Eilers, A.; Whitfield, J. et al. **c-jun and the transcriptional control of neuronal apoptosis**. *Biochem. Pharmacol.*, v.60, p.1015-1021, 2000.
- Hasselmo, M.E., Eichenbaum, H.B. **Hippocampal mechanism for the context-dependent retrieval of episodes**. *Neural. Netw.*, v.18(9), p.1172-1190, 2005.
- Hayes, A.E.; Davidson, M.C.; Keele, S.W. et al. **Toward a functional analysis of the basal ganglia**. *J. Cogn. Neurosci*, v.10, p.178-198, 1998.
- Health, D.L.; Vink, R. Traumatic brain axonal injury produce sustained decline in intracellular free magnesium concentration. *Brain Res.*, v.738, p.150-153, 1996.
- Hércules, H.C. **Energias de ordem física. Energia cinética. Instrumentos perfurocortantes. Armas de fogo**. In: *Medicina Legal*, (Ed. H. Gomes). Freitas Bastos: São Paulo, 1997.
- Hoshida, S.; Aoki, K.; Nishida, M.; Yamashita, M.; Igarashi, J.; Hori, M.; Kuzuya, T. and Tada, M. **Effects of preconditioning with ebselen on glutathione metabolism and stress protein expression**. *J.Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v.281(3), p.1471-1475, 1997.
- Imai, H.; Massayasu, H.; Dewar, D. et al. **Ebselen protects both Gray and White matter in a rodent model of focal cerebral ischemia**. *Stroke*, v.32, p.2149-2154, 2001.

- Impey, S.; Smith, D.M.; Obrietan, K. et al. **Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning.** Nat. Neurosci., v.1, p.595– 601, 1998.
- Izquierdo, I.; Cammarota, M.; Silva, W.C. et al. **The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple task.** Ann. Acad. Braz. Sci., v.80(1), p.115-127, 2008.
- Izquierdo, I.; Cammarota, M.; Medina, J. et al. **Pharmacological findings on the biochemical bases of memory processes: A general view.** Neur. Plast., v.11(3), p.159-189, 2004.
- Izquierdo, I. **Memória.** Porto Alegre: Artmed, 2002.
- Izquierdo, I.; Medina, J.H. **Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures.** Neurobiol. Learn Mem., v.68, p.285–316, 1997.
- Jacques-Silva, M C.; Nogueira, C. W.; Broch, L. C.; Flores, E. M.; Rocha, J. B. T. **Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice.** Pharmacol. Toxicol., v.88 (3), p.119-125, 2001.
- Javouhey, E.; Guérin, A.C.; Chiron, M. **Incidence and risk factors of severe traumatic brain injury resulting from road accidents: A population-based study.** Acci. Anal. Prev., v.38, p.25-33, 2006.
- Jozsef, L., & Filep, J. G. **Selenium-containing compounds attenuate peroxynitrite-mediated NF-kappaB and AP-1 activation and interleukin-**

8 gene and protein expression in human leukocytes. Free Radic Biol Med, v.35(9), p.1018-1027, 2003.

Kahraman, S.; Ozgurtas, T.; Kayali, H.; Atabey, C.; Kutluay, T.; Timurkaynak, E.

Monitoring of serum ionized magnesium in neurosurgical intensive care unit: preliminary results. Clin. Chim. Acta, v.334, p.211-215, 2003.

Kalueff, A.V. & Murphy, D.L. **The importance of cognitive phenotypes in experimental modeling of animal anxiety and depression.** Neural Plast., ID.52087, p.1-7, 2007.

Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessell, T.M. **Princípios da Neurosciência.** 4.ed. Barueri: Manole, 2003.

Kawaguchi, Y. **Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum.** J. Neurosci., v.13(11), p.4908-4923, 1993.

Kim, R.; Nakano, K.; Jayaraman, A. et al. **Projections of the globus pallidus and adjacent structures: na autoradiographic study in the monkey.** J. Comp. Neurol., v.169(3), p.263-290, 1976.

Kim, S. J.; Jeong, H. J.; Myung, N. Y.; Kim, M. C.; Jeong-Han Lee, J. H.; So, H. A.; Park, R. K.; Kim, H. M.; Um, J. Y.; and Hong, S. H. **The protective mechanism of antioxidants in cadmium-induced ototoxicity in vitro and in vivo.** Environmental health Perspectives, v.116(7), p.854-862, 2008.

Kinoshita, Y., Ueyzuma T., Senaba, E. et al. **Expression of c-fos, heat shock protein 70, neutrophins and cyclooxygenase-2 mRNA in response to**

- focal cerebral ischemial/reperfusion in rats and their modification by magnesium sulfate.** J. Neurotr., v.18, p.435-445, 2001.
- Koltz, L.O.; Sies, H. **Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids.** Toxicol. Lett., v.140-141, p.125-132, 2003.
- Kraus, J.F. & Nourjah, P. The epidemiology of mind, uncomplicated brain injury. J. Traum., v.28, p.1637-1643, 1998.
- Lee, J.A.; Lee, S.H.; Lee, C. et al. **PKA-activated ApAF-ApC/EBP heterodimer is a key downstream effector of ApCREB and is necessary and sufficient for the consolidation of long-term facilitation.** J. Cell Biol., v.174, p.827-838, 2007
- Leker, R.R.; Aharonowiz, M.; Greig, N.H. et al. **The role of p53-induced apoptosis in cerebral ischemia: effects of the p53 inhibitor pifithrin-alfa.** Exp. Neurol., v.187, p.478-486, 2004.
- Lin, A. **Activation of the JNK signaling pathway: breaking the breacke on apoptosis.** BioEssays, v.25, p.17-24, 2002.
- Lipton, S.A. and Rosenberg, P.A. **Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders.** New. Eng. J. Med., v.330, p.613-622, 1994.
- Lombroso, P. **Learning and memory.** Ver. Bras. Psiquiatr., v.26(3), p.207-210, 2004.

- Luchese, C.; Sthangerlin, E.C.; Ardais, A.P. et al. **Diphenyl diselenide prevents oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in lung of rat pups**. Toxicology, v.230, p.189-196, 2007.
- Luchese, C.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T. et al. **Cadmium inhibits delta-aminolenulinate dehydratase from rat lung in vitro: interaction with chelating and antioxidant agents**. Chem. Biol. Interact., v.165(2), p.127-137, 2007.
- Maciel, E. N.; Flores, E. M.; Rocha, J. B. T.; Folmer, V. **Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice**. Bull. Environ. Contam. Toxicol., v.70 (3), p.470-476, 2003.
- McDonald, J.W., Silverstein, F.S., Johnston, M.V. **Magnesium reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated brain injury in perinatal rats**. Neurosci. Lett., v.234, p.234-238, 1990.
- Means, A.R. **Year in basic science**. Mol. End., doi: 10.210/me.2008-0312, 2008.
- Meberg, P.J.; Kinney, R.W.; Valcourt, E.G. et al. **Gene expression of transcriptional factor NFkB in hippocampus: regulation by synaptic activity**. Brain Res. Mol., v.38, p.179-190, 1996.
- Meotti, F.C., Stangherlin, E.C., Zeni, G. et al. **Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation**. Environ. Res., v.94, p.276-282, 2004.
- Mesulam, M.M. **Spatial attention and neglect: parietal, frontal and cingulated contributions to the mental representation and attentional**

targeting of salient extrapersonal events. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., v.354, p.1325-1346, 1999.

Michalek, R.D.; Pellom, S.T.; Holbrook, B.C. et al. **The requirement of reactive oxygen intermediates for lymphocytic choriomeningitis virus binding and growth.** Virology, v.379(2), p.205-212, 2008.

Mink, F.W. & Thach, W.T. **Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior.** Curr. Opin. Neurobiol., v.3(6), p.950-957, 1993.

Mishra, O.P., Papadopoulos, M.D. **Cellular mechanism of hypoxic injury in the developing brain.** Brain Res. Bull., v.48, p.233-238, 1999.

Mogenson, G.J.; Swanson, L.W.; Wu, M. **Neural projections from nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata, and lateral preoptic-lateral hypothalamic area: an anatomical and electrophysiological investigation in the rat.** J. Neurosci., v.3(1), p.189-202, 1983.

Moretto, M. B.; Funchal, C.; Zeni, G.; Pessoa-Pureur, R. and Rocha, J. B. T. **Selenium compounds prevent the effect of methylmercury on the in vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex of young rats.** Toxicological Sciences, v.85, p.639-646, 2005.

Mugesh, G.; duMont, W.W.; Sies, H. **Chemistry of biologically important organoselenium compounds.** Chem. Rev., v.101, p.2125-2179, 2001.

Muller, A.; Cadenas, E.; Graf, P.; Sies, H. **A novel biologically active seleno-organic compound. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and**

antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). Biochem. Pharmacol., v.15, p.3235–3239, 1984.

Müller, A.; Gabriel, H.; Sies, H. et al. **A novel biologically active selenoorganic compound – VII. Biotransformation of ebselen in perfused rat liver.** Biochem. Pharmacol., v.37, p.1103-1109, 1998.

Nair, V.D. **Activation of p53 signaling initiate apoptotic death in cellular model of Parkinson's disease.** Apoptosis, v.11, p.955-966, 2006.

Nakamura, Y.; Feng, Q.; Kumagai, T. et al. **Ebselen, a glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant. Implication for inflammation-associated carcinogenesis.** J. Biol. Chem., v.277, p.2687-2694, 2002.

Navarro-Alarcón, M. and López-Martínez, M.C. **Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases.** Sci. Tot. Environ., v.249, p. 347-371, 2000.

Nicholls, D.; Attwell, D. **The release and uptake of excitatory aminoacids.** Trends Pharmacol. Sci., v.11, p.462-468, 1990.

Nogueira, C.W.; Rotta, L.L.; Tavares, R.G. et al. **BAL modulates glutamate transport in synaptosomes and synaptic vesicles from rat brain.** Neuroreport., v.12, p.511-514, 2001a.

Nogueira, C.W.; Souza, D.O.; Rocha, J.B.T. **Effect of dithiol chelating agents on MK-801 and glutamate binding to synaptic plasma membranes.** Neurochem. Res., v.12, p.1305-1310, 2001b.

Nogueira, C.W.; Rotta, L.N.; Perry, M.L. et al. **Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo**. Brain Res., v.906, p.157-63, 2001c.

Nogueira, C.W.; Meotti, F.C.; Curte, E. Et al. **Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats**. Toxicology, v.183, p.29-37, 2003a.

Nogueira, C.W., Soares, F.A., Nascimento, P.C. et al. **2,3-dimercaptoprapane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase mercury- and cadmium-induced inhibition of δ -aminolevulinate dehydratase**. Toxicology, v.184, p.85-95, 2003b.

Nogueira, C.W.; Quinhones, E.B.; Jung., E.A.C. et al. **Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide**. Inflamm. Res., v.52, p.56-63, 2003c.

Nogueira, C.W., Borges, V.C., Zeni, G. et al. **Organochalcogens affect on delta-aminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro**. Toxicology, v.191, p.169-178, 2003d.

Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B.T. **Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology**. Chem. Rev., v.104, p.6255-6285, 2004.

Ogawa, A.; Yoshimoto, T.; Kikuchi, H.; Sano, K.; Saito, I.; Yamaguchi, T.; Yasuhara, H. **Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial**. Cerebrovasc Dis, v.9(2), p. 112-118, 1999.

- Orban, P.C.; Chapman, P.F.; Brambilla, R. **Is the Ras-MAPK signaling pathway necessary for long-term memory formation?** Trends Neurosci., v.22, p.38-44, 1999.
- Pachalska, M.; Grochmal-Bach, B.; Will, M. et al. **Rehabilitation of an artist after right-hemisphere stroke.** Med. Sci. Monit., v. 14(10), p.110-124, 2008.
- Parnhan, M.J. and Graf, E. **Pharmacology of synthetic organic selenium compounds.** Prog. Drug Res. 36: 10-47, 1990.
- Parnham, M.J. and Graf, E. **Pharmacology of synthetic organic selenium compounds.** Prog. Drug Res. 36: 10-47, 1991.
- Paulmier, C. **Selenium reagents and intermediates.** In: Organic Synthesis. Oxford: Pergamon, 1986.
- Phol, D.; Bittgau, P.; Ishimaru, M.J. et al. **N-Methyl-D-Aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain.** Pharmacology, v.96, p.2508-2513, 1999.
- Platt, S.R. **The role of glutamate in central nervous system health and disease: A review.** Vet. J., v.173, p.278-286, 2007.
- Porciuncula, L.O.; Rocha, J.B.R.; Cimarosti, H. et al. **Neuroprotective effect of ebselen on rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation: correlation with immunoinhibition of inducible nitric oxide synthase.** Neurosci. Lett., v.346, p.101-104, 2003.

- Posser, T.; Kaster, M.P.; Baraúna, S.C. et al. **Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: Evidence for the involvement of the monoaminergic system.** Eur. J. Pharmacol., [Epub ahead of print], 2008.
- Purves, D.; Augustine, G.; Fitzpatrick, D.; Katz, L. C.; LaMantia, A-S.; McNamara, J. O.; Williams, S. M. **Neurociências**, 2 ed., Porto Alegre: Artmed, 2001. 347-443p.
- Puvanachandra, P. & Hyder, A.A. **Traumatic brain injury in Latin America and the Caribbean: a call for research.** Sal. Pub. Mex., v. 50(1), p.3-5, 2008.
- Ravishankar, S., Ashraf, Q.M., Fritz, K., Mishra, O.P., Papadopoulos M.D. **Expression of Bax and Bcl-2 proteins during hypoxia in cerebral cortical neuronal nuclei of newborn piglets: effect of administration of magnesium sulfate.** Brain Res., v.901, p.23-29, 2001.
- Reilly C. **Too much of a good thing? The problem of trace element fortification of foods.** Trends Food Sci. Technol., v.7, p. 139-142, 1996.
- Resnick, L. & Fennell, M. **Targeting JNK3 for the treatment of neurodegenerative disorders.** Drug Discov. Tod., v.9, p.932-939, 2004.
- Rosa, R.B.; Shcarzbolt, C.; Dalcin, B. et al. **Evidence that 3-hydroxyglutaric acid interacts with NMDA receptors in synaptic plasma membranes from cerebral cortex of young rats.** Neurochem. International, v.45, p.1087-1094, 2004.

- Rosa, R.M.; Flores, D.G.; Happelt, H.R. et al. Facilitation of long-term object recognition memory by pretreatment administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci. Lett.*, v.341, p.217-220, 2003.
- Rossato, J.I.; Bevilaqua, R.M.; Myskiw, J.C. et al. **On the role of hippocampal protein synthesis in the consolidation and reconsolidation of object recognition memory.** *Learn Mem.*, v.14(1-2), p.36-46, 2007.
- Rossato^a, J.I.; Zinn, C.G.; Furini, C. et al. **A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain.** *Ann. Braz. Acad. Sci.*, v.78(3), p.515-523, 2006.
- Rossato^b, J.I.; Bevilaqua, L.R.M.; Medina, J.H. et al. **Retrieval induces hippocampal-dependent reconsolidation of spatial memory.** *Learn & Mem.*, v.13, p.431-440, 2006.
- Rossato, J.I.; Ketzer, L.A.; Centurião, F.B. et al. **Antioxidant properties of new chalcogenides against lipid peroxidation in rat brain.** *Neurochem. Res.*, v.27(4), p.297-303, 2002.
- Russo, R.; Fox, E.; Bowles, R.J. **On the status of implicit memory bias in anxiety.** *Cogn. Emot.*, v.13(4), p.435-456, 1999.
- Saatman, K.E.; Bareyre, F.M.; Grady, M.S. et al. **Acute cytoskeleton alterations and cell death induced by experimental brain injury are attenuated by magnesium treatment and exacerbated by magnesium deficiency.** *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, v.60(2), p.183-194, 2001.
- Saito, I.; Asano, T.; Sano, K.; Takakura, K.; Abe, H.; Yoshimoto, T.; Kikuchi, H.; Ohta, T.; Ishibashi, S. **Neuroprotective effect of an antioxidant, ebselen,**

in 123 patients with delayed neurological deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Neurosurgery, v.42(2), p.269-277, 1998.

Santarelli, L.; Saxe, M; Gross, C. **Requeriment of hippocampal neurogenesis for the vehavioral effects of antidepressants.** Science, v. 301, p.805-809, 2003.

Schacter, D.L.^a **The cognitive neuroscience of memory: perspectives from neuroimagin research.** Phil. Trans. R. Soc. Lond. B., v.352, p1689-1695, 1997.

Schacter, D.L.^b **Implicit knowledge: New perspectives on unconscious processes.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.89, p.11.113-11.117, 1992.

Schramm-Sapyta, N.L.; Kingsley, M.A.; Rezvani, A.H. et al. **Early ethanol consumption predicts relapse-like behavior in adolescent male rats.** Alcohol Clin. Exp. Res., v. 32(5), p.754-762, 2008.

Schulz, D.; Kouri, C.; Huston, J.P. **Behavior on the water maze platform: relationship to learning and open field exploration in aged and adult rats.** Brain Res. Bull., v.74(4), p.206-215, 2007.

Shaw, N.A. **The neurophysiology of concussion.** Progr. Neurobiol., v.67, p.281-344, 2002.

Shewe, T. **Molecular actions of ebselen, an anti-inflammatory antioxidant.** Gen. Pharmacol., v.26, p.1153-1169, 2005.

- Shon, S.; Kim, E.; Gwag, B.J. **Glutamate neurotoxicity of mouse cortical neurons: atypical necrosis with DNA ladders and chromatin condensation.** *Neurosci. Lett.*, v.240, p.147-150, 1998.
- Sies, H.; Stahl, W.; Sevanian, A. **Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress.** *J. Nutr.*, v.135(5), p.969-972, 2005.
- Sies, H. **Ebselen: a glutathione peroxidase mimic.** *Meth. Enzymol.*, v.234, p.467-482, 1994.
- Sies, H. **Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic.** *Free Rad. Biol. Med.* v.14, p.313–323, 1993.
- Sies, H.; Bartoli, G.M.; Burk, R.F. et al. **Glutathione efflux from perfused rat liver after Phenobarbital treatment, during drug oxidations, and in selenium deficiency.** *Eur. J. Biochem.*, v.89(1), p.113-118, 1978.
- Silva, W.C.; Bonini, J.S.; Bevilaqua, L.R. et al. **Inhibition of mRNA synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation of spatial memory.** *Hippocampus*, v.18(1), p.29-39, 2008.
- Silva, A.J.; Kogan, J.H.; Frankland, P.W. et al. **CREB and memory.** *Ann. Rev. Neurosci.*, v.21, p.127–148, 1998.
- Singh, S. & Dikshit, M. **Apoptotic neuron death in Parkinson's disease: Involvement of nitric oxide.** *Brain Res. Rev.*, v.100464(4C), p.1-19, 2007.
- Solís, A.A.; Behancourt, J.A.; Britton, G.B. **Chronic sildenafil (Viagra) administration reduces anxiety in intact and castrated male rats.** *Psicothema.*, v.20(4), p.812-817, 2008.

- Sonnewald, U.; Westergaard, N.; Schousboe, A. **Glutamate transport and metabolism in astrocytes**. *Glia*, v.21, p.56-63, 1997.
- Squire, L.R. **Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans**. *Psychol. Rev.*, 99: 195-231, 1992.
- Stadtman, T.C. **Selenium-dependent enzymes**. *Annu. Rev. Biochem.*, v.49, p.93 -110, 1980.
- Stangherlin, E.C.; Luchese, C.; Pinton, S. et al. **Sub-chronical exposure to diphenyl diselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats**. *Brain Res.*, v.1201, p.106-113, 2008.
- Stangherlin, E.C.; Favero, A.M.; Zeni, G.; Rocha, J.B.T. **Teratogenic vulnerability of wistar rats to diphenyl ditelluride**. *Reprod. Toxicol.*, 20: 561-568, 2005.
- Stansfield, K.H. & Kirstein, C.L. **Chronic cocaine or ethanol exposure during adolescence alters novelty-related behaviors in adulthood**. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.86(4), p.637-642, 2007.
- Stapleton, S.R.; Garlock, G.L.; Foellmi-Adams, L. et al. **Selenium: potent stimulator of tyrosyl phosphorylation and activator of MAP kinase**. *Biochem. Biophys. Acta.*, v.1355, p.259-269, 1997.
- Stocchetti, N.; Conte, V.; Canavesi, K. **“New” italian guidelines for adult traumatic brain injury: a tool with potential and limitations**. *Minerva Anesthesiol.*, v.74(10), p.571-577, 2008.

- Tabuchi, A.; Nakaoka R.; Amano K. et al. **Differential Activation of Brain-derived Neurotrophic Factor Gene promoters I and III by Ca²⁺ Signals Evoked via L-type Voltage-dependent and N-Methyl-D-aspartate Receptor Ca²⁺ Channels.** J. Biol. Chem., v.275, p.17269-17275, 2000.
- Takasago, T.; Peters, E.E.; Graham, E.I. et al. **Protective efficacy of ebselen, an antioxidant with anti-inflammatory actions in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion.** Braz. J. Pharmacol., v.122, p.1251-1256, 1997.
- Tao X.; Finkbeiner S.; Arnold, D.B. et al. **Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by CREB family transcription factor-dependent mechanism.** Neuron, v.20, p.709-726, 1998.
- Thompson, H.J.; McCormick, W.C.; Kagan, S.H. Traumatic brain injury in older adults: epidemiology, outcomes, and future implications. J. Am. Geriatr. Soc., v.54(10), p.1590-1595, 2006.
- Thompson, R.F., Kim, J.J. **Memory systems in the brain and localization of a memory.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 1438-1344, 1996.
- Thomson, R.F. **The neurobiology of learning and memory.** Science, v.223, p.941-947, 1986.
- Tulving, E. **Episodic memory: from mind to brain.** Ann. Rev. Psych., 52: 1-25, 2002.
- Tulving, E., Schacter, D.L. **Priming and human memory system.** Science, 247: 301-306, 1990.

- Türkyilmaz, C., Türkyilmaz Z., Atalay, Y. et al. **Magnesium pre-treatment reduces neuronal apoptosis in newborn rats in hypoxia-ischemia.** Brain Res., v.955, p.133-137, 2002.
- Vander, A.J.; Sherman, J.H.; Luciano, D.S. **Human physiology mechanisms of body function**, 8th ed. Boston: McGrill-Hill, 2001.
- Verfaellie, M., Koseff, P., Alexander, M.P. **Acquisition of novel semantic information in amnesia: effects of lesion location.** Neuropsychiatry, 38(4): 484-492, 2000.
- Vianna^a, M.R.M., Izquierdo, L.A., Barros, D.M. et al. **Pharmacological differences between memory consolidation of habituation to an open field and inhibitory avoidance learning.** Braz. J. Med. Biol. Res., v.34, p. 233-240, 2001.
- Vianna^b, M.R.M. Szapiro, G., McGaugh, J.L. et al. **Retrieval of memory for fear-motivated training initiates extinction requiring protein synthesis in the rat hippocampus.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.98(21), p.12251-12254, 2001.
- Vianna^c, M.R.M., IZQUIERDO, L.A., BARROS, D.M., et al.. **Short and Long-term memory: Differential involvement of neurotransmitter systems and signal transduction cascades.** Ann. Acad. Bras., v.72(3), p.353-364, 2000.
- Vink, R., O'Connor, C.A., Nimmo, A.J. et al. **Magnesium attenuates persistent functional deficits following diffuse brain traumatic injury in rats.** Neurosci. Lett., v.336, p.41-44, 2003.

- Vrie, J.; Menovsky, T.; vanGulik, S. et al. **Histological effects of fibrin glue on nervous tissue: A safety study in rats.** Surg. Neurol., v.57, p.415-422, 2002.
- Wagner, A.K.; Postal, B.A.; Darrah, S.D. et al. **Deficits in novelty exploration after controlled cortical impact.** J. Neurotr., v.24(8), p.1308-1320, 2007.
- Walz, R.; Lenz, G.; Roesler, R. et al. **Time-dependent enhancement of inhibitory avoidance retention and MAPK activation by post-training infusion of nerge growth factor into CA1 region of hippocampus of adult rats.** Eur. J. Neurosci., v.12, p.2185-2189, 2000^a.
- Walz, R.; Rockenbach, I.C.; Amaral, O.B.et al. **MAPK and memory.** Trends Neurosci., v.22, p495, 1999^b.
- Wanger, P. D.; Pedersen, N. D.; Hatfield, J.; Weswing, P. H. **Absortion of selenite and selenomethionine from ligated digestive tract segments in rats.** Proc. Soc.Exp. Biol. Med. v.153, p.295-295, 1976.
- Wickens, J.R.; Arbuthnott, G.W.; Shindou, T. **Simulation of GABA function in the basal ganglia: computational models of GABAergic mechanisms in basal ganglia function.** Prog. Brain Res., v.160, p.313-329, 2007.
- Wiklund, A.; Granon, S.; Cloëz-Tayarani, I. et al. **Sevoflurane anesthesia alters exploratory and anxiety-like behavior in mice lacking the beta2 nicotinic acetylcholine receptor subunit.** Anesthesiology, v.109(5), p.790-798, 2008.

- Wilson, S.R.; Zucher, P.A.; Huang, R.C. et al. **Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity.** J. Am. Chem. Soc., v.111. p.5934, 1989.
- Xiao, M.-Y.; Gustafsson, B.; Niu, Y.-P. **Metabotropic glutamate receptor in the trafficking of ionotropic glutamate and GABA_A receptors at central synapses.** Curr. Neuropharmacol., v.4, p.77-86, 2006.
- Xie, L.H.; Chen, F.; Karagueuzian, H.S. et al. **Oxidative stress-induced afterdepolarizations and calmodulin kinase II signaling.** Circ. Res., [Epub ahead of print], 2008.
- Xie, Q. & Nathan C. **The high-output nitric oxide pathway: role and regulation.** J. Leuc. Biol., v.56, p.576-582, 1994.
- Yamagushi, T.; Sano, K.; Takamura, K. et al. **Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo-controlled, Double-blind clinical Trial. Ebselem study group.** Stroke, v.29(1), p.12-17, 1998.
- Yin, J.C.P.; Tully, T. **CREB and the formation of long-term memory.** Curr. Opin. Neurobiol., v.6, p.204–208, 1996.
- Zasso, F.B.; Goncales, C.E.P.; Jung, E.A.C. et al. **On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide.** Environ. Toxicol. Pharmacol., 19: 283-289, 2005.
- Zeni, G.; Panatieri, R.B.; Lissner, E.; Menezes, P.H.; Braga, A.L.; Stefani, H.A. **Synthesis of polyacetylenic acids isolated from Heisteria Acuminata.** Org. Lett., v.6, p.819-821, 2001.

Zhang, M.; Nomura, A.; Uchida, Y. et al. **Ebselen supresses late airway response and airway inflammation in guinea pigs.** Free Radic. Biol. Med., v.32, p.454-464, 2002.

Zhao, R.; Holmgren, A. **A novel antioxidant mechanism of ebselen involving ebselen diselenide, a substrate of mammalian thiredoxin and tireodoxin reductase.** J. Biological Chemistry, vol. 277 (42), p.39456-39462, 2002.