

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**SELENOFURANOSÍDEO MELHORA O PREJUÍZO À MEMÓRIA DE
LONGA DURAÇÃO EM RATOS EXPOSTOS AO GLUTAMATO
MONOSSÓDICO: ENVOLVIMENTO DA ENZIMA Na^+ , K^+ -ATPASE**

JULIANA BERNERA RAMALHO

URUGUAIANA

2016

JULIANA BERNERA RAMALHO

**SELENOFURANOSÍDEO MELHORA O PREJUÍZO À MEMÓRIA DE
LONGA DURAÇÃO EM RATOS EXPOSTOS AO GLUTAMATO
MONOSSÓDICO: ENVOLVIMENTO DA ENZIMA Na^+ , K^+ -ATPASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Marina Prigol

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Francielli Weber Santos Cíbin

**Uruguaiiana
2016**

JULIANA BERNERA RAMALHO

**SELENOFURANOSÍDEO MELHORA O PREJUÍZO À MEMÓRIA DE
LONGA DURAÇÃO EM RATOS EXPOSTOS AO GLUTAMATO
MONOSSÓDICO: ENVOLVIMENTO DA ENZIMA Na^+ , K^+ -ATPASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção
Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 19 de março de 2016.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Marina Prigol
Orientadora
(UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a. Daiana Silva Ávila
(UNIPAMPA)

Prof^a. Dr^a. Simone NoreMBERG Kunz
(UNIPAMPA)

Dedico aos avós, Vanderlei e Emília e, à minha mãe, Adriana, pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Marina Prigol, que sempre foi fonte inesgotável de apoio e incentivo, mesmo quando tudo parecia não dar certo. Pela orientação, pelo carinho, pela amizade e por ser um exemplo a ser seguido, muito obrigada!

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. Francielli Cibin, por todo o carinho, compreensão e ensinamentos. Obrigada pelo incentivo, pela amizade e, também, por ser exemplo de amor e dedicação àquilo que faz. Muito obrigada, Fran!

À família Biotech, Aryele, Natasha, Melina, Cristiano e Flávio, que me recebeu de braços abertos. Em especial à Ary pela companhia incansável em todos os dias de administração e, ainda, por ter me ensinado a gostar dos ratinhos! Mê e Cristcho pela ajuda nos testes comportamentais. A todos agradeço pela convivência, pelo trabalho, pelos ensinamentos e pelas risadas. Sem vocês, todos os contratemplos encontrados teriam sido ainda maiores. Muito obrigada!

Ao meu namorado/marido, Tiago, por entender os meus momentos de ausência e nervosismo, sempre me apoiando, com amor, carinho, amizade e muita paciência. Por ser meu exemplo de esforço, dedicação e superação.

À minha família, meus avós, Vanderlei e Emília, e minha mãe, Adriana, pelo amor incondicional. Aos meus irmãos, Andrew e Cristhian e meus tios, Daniel e Josi pelo companheirismo. Amo vocês!

Por fim, gostaria de agradecer àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e à UNIPAMPA pela oportunidade. Também, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – FAPERGS, pela concessão da bolsa de estudos.

Muito obrigada!

*“If you can find a path with no obstacles,
it probably doesn’t lead anywhere.”*

Frank Clark

RESUMO

O glutamato é um dos mais importantes neurotransmissores excitatórios presentes no sistema nervoso central e participa de uma variedade de processos fisiológicos, desempenhando papel importante na plasticidade sináptica, aprendizagem e memória. Seu excesso leva a uma ativação excessiva dos seus receptores, desencadeando excitação das células nervosas podendo levá-las à morte e, essa tem sido apontada como causa de diversas doenças neurodegenerativas. O glutamato monossódico (MSG) é um realçador de sabor amplamente utilizado na indústria de alimentos e, embora vários agonistas glutamatérgicos específicos possam imitar os efeitos tóxicos do glutamato, o MSG é possivelmente o agente mais comumente utilizado para caracterizar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na excitotoxicidade induzida pelo glutamato. Ainda, diversos estudos têm demonstrado prejuízos de aprendizagem e memória em animais expostos ao MSG. Já está estabelecido que o selênio (Se) é eficaz na prevenção de uma série de condições degenerativas, incluindo doenças inflamatórias e neurológicas e, estudos têm relatado que os compostos orgânicos de Se são capazes de melhorar a memória em roedores. O Selenofuranosídeo é um composto orgânico de Se e sua capacidade neuroprotetora foi demonstrada recentemente em um modelo de demência esporádica em camundongos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o possível efeito protetor do selenofuranosídeo frente ao prejuízo à memória de longa duração, atividades das enzimas Na^+ , K^+ -ATPase e AChE e estresse oxidativo em ratos Wistar machos com 5 semanas de idade expostos ao MSG. O MSG (2g/kg) e o selenofuranosídeo (5 mg/kg) foram administrados por via oral durante 10 dias. Nos dias 11 e 12, os animais foram submetidos aos testes comportamentais (open-field e esQUIVA inibitória) e posterior eutanásia. Sangue, fígado, rim, córtex e hipocampo foram removidos para determinação dos parâmetros de estresse oxidativo e bioquímicos. Ainda, os tecidos cerebrais foram utilizados para determinar a atividade das enzimas Na^+ , K^+ -ATPase e AChE. Os resultados obtidos demonstram que a exposição ao MSG levou a uma alteração de memória, observada através da diminuição no tempo de latência no teste de esQUIVA inibitória, acompanhada da diminuição da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase no hipocampo e córtex. O tratamento com selenofuranosídeo mostrou-se eficaz em proteger contra o prejuízo de memória associado à exposição ao MSG, através do aumento na latência no teste de esQUIVA inibitória e da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase no hipocampo. Não houve alteração nos parâmetros de estresse oxidativo avaliados e na atividade da AChE. Nossos resultados sugerem que o tratamento com selenofuranosídeo foi efetivo em melhorar a alteração

de memória apresentada pelos animais expostos ao MSG e que esse composto pode ser um potencial agente terapêutico alternativo para o tratamento de doenças neurodegenerativas.

Palavras-chave: glutamato monossódico, selenofuranosídeo, Na^+, K^+ -ATPase, memória

ABSTRACT

Glutamate is the major excitatory neurotransmitter present in the central nervous system. It participates in a variety of physiological processes and plays an important role in synaptic plasticity, learning and memory. Its excess leads to excessive activation of its receptors, triggering excitation of nerve cells and may lead them to death, and this has been identified as the cause of several neurodegenerative diseases. Monosodium glutamate (MSG) is a flavor enhancer widely used in the food industry and, although several specific glutamatergic agonists can mimic the toxic effects of glutamate, MSG is possibly the most commonly used agent to characterize the cellular and molecular mechanisms involved in glutamate-induced excitotoxicity. Also, several studies have shown learning and memory loss in animals exposed to MSG. It is already established that the selenium (Se) is effective in preventing a number of degenerative conditions, including inflammatory and neurological diseases, and studies have reported that organoselenium compounds are able of enhancing memory function in rodents. The Selenofuranoside is a new organoselenium compound and their neuroprotective capacity was recently demonstrated in a sporadic dementia model in mice. The aim of this study was to evaluate the possible protective effect of selenofuranoside against impairment to long-term memory, the enzymes Na^+ , K^+ -ATPase and AChE activities and oxidative stress in male Wistar rats at 5 weeks of age exposed to MSG. The MSG (2g/kg) and selenofuranoside (5mg/kg) were orally administered for 10 days. In the days 11 and 12, the animals were subjected to behavioral tests (open-field and inhibitory avoidance) and subsequent euthanasia. Blood, liver, kidney cortex and hippocampus were removed for determination of oxidative stress and biochemical parameters. Also, the brain tissues were used to determine enzymes Na^+ , K^+ -ATPase and AChE activities. The results showed that exposure to MSG led to memory loss observed by decreasing the latency time in the inhibitory avoidance test, accompanied by decreased activity of Na^+ , K^+ -ATPase in the hippocampus and cortex. Treatment with selenofuranoside proved effective in protecting against memory loss associated with exposure to MSG by increasing the latency in the inhibitory avoidance test and the enzyme activity of Na^+ , K^+ -ATPase in the hippocampus. There was no change in the evaluated parameters of oxidative stress and the AChE activity. Our results suggest that treatment with selenofuranoside was effective in improving the memory impairment presented by animals exposed to MSG and that this compound can be a potential alternative therapeutic for the treatment of neurodegenerative diseases.

Key words: monosodium glutamate, selenofuranoside, Na⁺,K⁺-ATPase, memory

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - Neurotransmissão glutamatérgica | 19 |
| FIGURA 2 - Estruturas moleculares do ácido glutâmico e do glutamato monossódico..... | 20 |
| FIGURA 3 - Excitotoxicidade em neurônios glutamatérgicos..... | 22 |
| FIGURA 4 – Ciclo Glu-Gln entre neurônios e astrócitos | 24 |
| FIGURA 5 - Estrutura do selenofuranosídeo | 28 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina

AChE – Acetilcolinesterase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DA – Doença de Alzheimer

EAATs – Transportadores de aminoácidos excitatórios (do inglês *excitatory amino acid transporters*)

GLAST – Transportador de glutamato/aspartato

Gln - Glutamina

GLT-1 – Transportador de glutamato

Glu - Glutamato

GluTs – Transportadores de glutamato sódio-dependentes

iGluR – Receptor ionotrópico de glutamato

MCD – Memória de curta duração

mGluR – Receptor metabotrópico de glutamato

MLD – Memória de longa duração

MSG – Glutamato monossódico

NMDAR – Receptor N-metil-D-aspartato

Na⁺, K⁺-ATPase – Sódio potássio ATPase

SNC – Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------------------------------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO..... | 16 |
| 2.1 Memória | 16 |
| 2.2 Glutamato | 17 |
| 2.3 Glutamato Monossódico..... | 19 |
| 2.4 Glutamato e o Sistema Nervoso Central | 21 |
| 2.4.1 Glutamato Monossódico e Memória | 22 |
| 2.5 Na ⁺ , K ⁺ -ATPase..... | 23 |
| 2.6 Acetilcolinesterase (AChE) | 24 |
| 2.8 Compostos orgânicos de selênio | 26 |
| 2.8.1 Selenofuranosídeo | 27 |
| 3 OBJETIVOS..... | 29 |
| 3.1 Objetivo Geral | 29 |
| 3.2 Objetivos Específicos | 29 |
| 4 MANUSCRITO..... | 30 |
| 1. Introduction | Erro! Indicador não definido. |
| 2. Material and Methods..... | Erro! Indicador não definido. |
| 2.1. Chemicals | Erro! Indicador não definido. |
| 2.2. Animals | Erro! Indicador não definido. |
| 2.3. Treatment..... | Erro! Indicador não definido. |
| 2.4 Behavioral Tests | Erro! Indicador não definido. |
| 2.4.1 Open-Field Test (OFT)..... | Erro! Indicador não definido. |
| 2.4.2 Step-Down Passive-Avoidance Test (SDPA)..... | Erro! Indicador não definido. |
| 2.5 Biochemical Analysis..... | Erro! Indicador não definido. |
| 2.5.1 Reactive Species (RS) | Erro! Indicador não definido. |
| 2.5.2 Catalase (CAT) Activity..... | Erro! Indicador não definido. |
| 2.5.3 Superoxide Dismutase (SOD) Activity..... | Erro! Indicador não definido. |
| 2.5.4 Lipid peroxidation (TBARS) | Erro! Indicador não definido. |
| 2.5.5 Ferric reducing antioxidant potential (FRAP)..... | Erro! Indicador não definido. |
| 2.5.6 Na ⁺ , K ⁺ ATPase activity | Erro! Indicador não definido. |
| 2.5.7 Acetylcholinesterase | Erro! Indicador não definido. |
| 2.5.8 Protein Determination..... | Erro! Indicador não definido. |

| | |
|---|--------------------------------------|
| 2.6 <i>Statistical Analysis</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 3. Results | Erro! Indicador não definido. |
| 3.1 <i>Open-Field Test (OFT)</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 3.2 <i>Step-Down Passive-Avoidance Test (SDPA)</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 3.3 <i>Biochemical analysis</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 3.4 <i>Reactive Species, catalase, superoxide dismutase, lipid peroxidation and ferric reducing antioxidant potential</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 3.5 <i>Na⁺, K⁺ ATPase activity</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 3.6 <i>Acetylcholinesterase</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 4. Discussion..... | Erro! Indicador não definido. |
| 5 CONCLUSÕES | 31 |
| REFERÊNCIAS | 32 |
| ANEXO A – Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA | 37 |

1 INTRODUÇÃO

Há muitos anos, os aditivos alimentares têm sido utilizados como realçadores de sabor, corantes, conservantes, dentre outras funções (RANGAN; BARCELOUX, 2009). O glutamato monossódico (MSG) é um dos aditivos alimentares mais utilizado do mundo e está presente em grande parte dos alimentos processados como realçador de sabor, pois aumenta sua palatabilidade (BEYREUTHER et al., 2007; HUSAROVA; OSTATNIKOVA, 2013).

O glutamato (Glu) é um aminoácido não essencial encontrado naturalmente em muitos alimentos nas formas ligada, como componente de proteínas e, na forma livre. Além disso, é o mais abundante neurotransmissor excitatório presente no sistema nervoso central (SNC) (JINAP; HAJEB, 2010). Ele participa de uma variedade de processos fisiológicos e desempenha papel importante na plasticidade sináptica, aprendizagem e memória. O excesso de Glu leva a uma superativação dos seus receptores, desencadeando a superexcitação das células nervosas podendo levá-las à morte através de um processo chamado “excitotoxicidade” (MEHTA et al., 2013). Essa tem sido apontada como a causa de diversas doenças neurodegenerativas, agudas e crônicas, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, isquemia, entre outras (LAU; TYMIANSKI, 2010).

Estudos recentes têm demonstrado prejuízos de aprendizagem e memória em animais expostos ao MSG. Efeitos adversos foram observados após repetidas administrações de MSG, demonstrados através do prejuízo na memória de reconhecimento e, também, na memória de curto e longo prazo no labirinto aquático de Morris. Estes resultados foram relacionados a diminuição dos níveis plasmáticos e cerebrais de triptofano (KHALIQ et al., 2015). Também foi demonstrada a relação entre a administração de MSG e o aumento do acúmulo da proteína β -amilóide no hipocampo, que é uma característica fundamental da doença de Alzheimer, síndrome neurodegenerativa progressiva caracterizada principalmente pela perda de memória e deficiência intelectual (DIEF et al., 2014).

Tem sido demonstrado que a Na^+ , K^+ -ATPase, uma enzima que utiliza a energia liberada pela hidrólise de ATP para transportar Na^+ e K^+ , desempenha importante papel na plasticidade neuronal e sináptica, modulando a aprendizagem e a memória (BRUNELLI et al., 1997; WYSE et al., 2004; SCURI et al., 2007), além de regular a captação de Glu (ZHANG et al., 2015). A enzima acetilcolinesterase (AChE), por sua vez, tem sido alvo de estudo como estratégia terapêutica emergente para o tratamento de distúrbios cognitivos, como a doença de Alzheimer

(AD). Esta enzima é responsável por regular os níveis de acetilcolina (ACh), um neurotransmissor notavelmente envolvido nos processos de aprendizagem, memória e atenção, e que participa da codificação de novas informações, na fenda sináptica (ROBINSON et al., 2011). Ainda cabe salientar, que alguns estudos têm relacionado a excitotoxicidade do MSG com o estresse oxidativo (RAMANATHAN et al., 2007; SHIVASHARAN et al., 2013; SWAMY et al., 2013). Desta maneira, compostos com propriedades antioxidantes poderiam ser uma alternativa na proteção ou tratamento do dano oxidativo induzido por esse composto.

Já está estabelecido que o selênio (Se) é eficaz na prevenção de uma série de condições degenerativas, incluindo doenças inflamatórias e neurológicas, como a doença de Alzheimer (DA) (XIONG et al., 2007; LOEF et al., 2011). Os compostos orgânicos de selênio vêm ganhando espaço nas pesquisas como forma de tratamento das doenças neurodegenerativas, melhorando a função da memória em roedores, sem induzir neurotoxicidade (ROSA et al., 2003; STANGHERLIN et al., 2008; PINTON et al., 2010; SOUZA et al., 2010). Estudo prévio demonstrou a capacidade neuroprotetora do selenofuranosídeo, um novo composto orgânico de selênio, constituído por uma molécula simples de carboidrato contendo uma molécula de Se, em um modelo de demência esporádica do tipo-Alzheimer induzido pela injeção intracerebroventricular de A β ₂₅₋₃₅ em camundongos (SPIAZZI et al., 2015). Desta forma, o presente trabalho avaliou o efeito da exposição ao MSG sobre a memória, bem como o papel protetor do selenofuranosídeo frente aos danos induzidos pelo MSG em ratos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Memória

A memória é definida como a capacidade de armazenar informações que possam ser recuperadas e utilizadas posteriormente. Ela pode ser classificada de acordo com diferentes critérios, por exemplo, de acordo com o tempo que duram e com o seu conteúdo. De acordo com o critério temporal, a memória de curta duração (MCD) é definida como aquela que só pode ser evocada por um curto período de tempo, geralmente horas, após a sua formação. A memória de longa duração (MLD) por sua vez, pode ser definida como aquela que pode ser evocada dias, semanas ou anos após a aquisição (IZQUIERDO et al., 1998). Já de acordo com o seu conteúdo, a memória pode ser dividida em: memórias declarativas, como eventos, fatos, conhecimentos. A memória aversiva, por exemplo, é considerada um subtipo de memória declarativa. E, memórias de procedimentos ou hábitos, que são aquelas que adquirimos e evocamos de maneira mais ou menos automática, como por exemplo andar de bicicleta (IZQUIERDO et al., 2013).

A memória resulta de, pelo menos, três tipos de processamento diferentes, mas relacionados entre si: aquisição, consolidação e evocação. A aquisição representa a aprendizagem, refere-se aos processos pelos quais novas informações aprendidas são tratadas e processadas quando encontradas pela primeira vez. A fixação e armazenamento de uma informação recém adquirida ou aprendida é chamada de consolidação. A evocação é a recordação, a lembrança daquilo que foi aprendido previamente (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000; DUDAI, 2004; SQUIRE, 2004).

Em modelos animais são utilizados diversos testes, baseados no aprendizado de tarefas comportamentais, com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos nos processos de memória. Um dos testes mais utilizados é a esQUIVA INIBITÓRIA. Este teste consiste em um aparelho com a parte frontal confeccionada em acrílico transparente, o assoalho é formado por uma grade de barras de bronze paralelas, separadas entre si por 1 cm. Na parte esquerda, sobre a grade, há uma plataforma com 2,5 cm de altura. O rato é colocado sobre a plataforma, com o assoalho conectado a um estimulador elétrico. Na sessão de treino, quando o animal desce da plataforma e toca as grades com as quatro patas, recebe um choque elétrico de 0.5 mA. Para avaliação da MLD, 24 horas depois da sessão de treino, os animais são submetidos ao teste.

Para avaliar o quanto o animal aprendeu durante a reexposição ao aparato, mede-se o tempo que o animal leva para descer da plataforma (latência de descida). Quanto mais tempo o animal permanece na plataforma, maior será a latência de descida, significando que ele reteve a memória aversiva formada durante o treino.

Nessa tarefa, o animal aprende a associar o contexto do aparato, inicialmente não aversivo, ao recebimento de choque elétrico. Este teste produz aprendizado a partir de uma única tentativa, tornando-o ideal para o estudo de processos envolvidos na aprendizagem e memória (IZQUIERDO; MEDINA, 1997), envolvendo a repressão específica da tendência natural dos ratos para explorar o ambiente além da plataforma. Na tarefa de esquiva inibitória, a formação da memória aversiva no rato está associada a ativação de receptores glutamatérgicos, aumento nos níveis intracelulares de Ca^{2+} e ativação de vias de sinalização que resultam em síntese de novas proteínas (IZQUIERDO et al., 2006).

Diferentes tipos de aprendizagem envolvem estruturas cerebrais distintas para o condicionamento inibitório, tais como hipocampo e córtex entorrinal. A consolidação das tarefas aversivas requer também a participação paralela do núcleo basolateral da amígdala (IZQUIERDO et al., 2006; CAMMAROTA et al., 2008). O hipocampo é a estrutura central da formação de memórias declarativas de curta e longa duração. Ele é um importante centro de plasticidade sináptica e sua atividade é amplamente modulada por outras áreas como a amígdala e o córtex entorrinal (IZQUIERDO et al., 2013). Essa estrutura é capaz de armazenar a memória de longo prazo durante horas ou dias e transferi-la gradativamente para regiões específicas do córtex. Quando há um dano parcial no hipocampo, são produzidos vários graus de amnésia e, quando esta estrutura é totalmente destruída, nada mais é consolidado e pouco pode ser recordado (IZQUIERDO; MEDINA, 1997; IZQUIERDO et al., 1998).

2.2 Glutamato

O glutamato é o mais abundante neurotransmissor excitatório presente no SNC. Além de neurotransmissor, o glutamato é um aminoácido não essencial encontrado naturalmente em muitos alimentos nas formas ligada, como componente de proteínas e, na forma livre (JINAP; HAJEB, 2010). Ele participa de uma variedade de processos fisiológicos e desempenha papel importante na plasticidade sináptica, aprendizagem e memória; atuando também como

mediador de informações sensoriais, coordenação motora e emoções (MEHTA et al., 2013). O excesso de Glu leva a uma ativação excessiva dos seus receptores, desencadeando uma superexcitação das células nervosas podendo leva-las à morte através de um processo referido como “excitotoxicidade”. Esta tem sido apontada como causa de diversas doenças neurodegenerativas, agudas e crônicas, como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, isquemia, entre outras (LAU; TYMIANSKI, 2010).

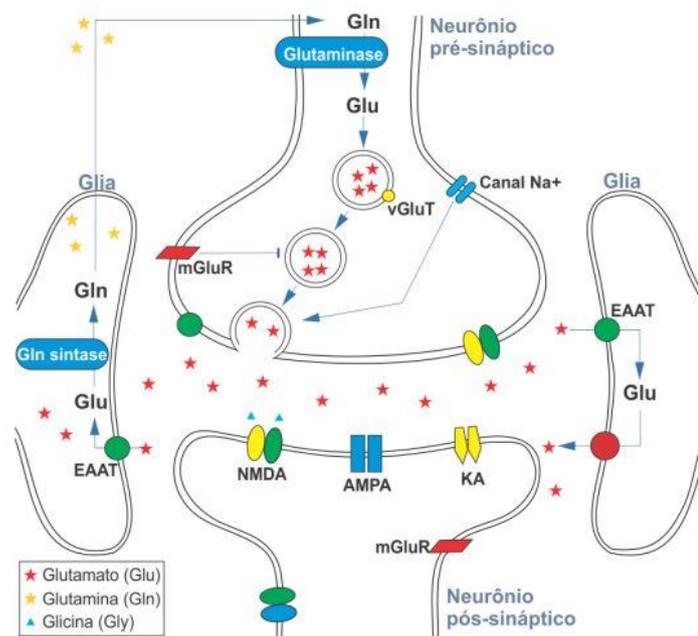
Os receptores de glutamato incluem três famílias de receptores ionotrópicos (iGluR), que são canais iônicos cuja abertura é favorecida quando o glutamato liga-se ao receptor, são elas: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA) e Cainato (KA). E, três grupos de receptores metabotrópicos (mGluR), os quais são receptores acoplados à proteína G e participam dos mecanismos de resposta intracelular através da ativação de segundos mensageiros. Atualmente, são conhecidos oito mGluR diferentes (mGluR1-8). Eles estão dispersos por todo o sistema nervoso central, incluindo a amígdala, o hipocampo e o hipotálamo, onde regulam muitas funções metabólicas vitais (LAU; TYMIANSKI, 2010).

Também cabe ressaltar a presença dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EEATs), dentre os quais podemos destacar: GLAST (transportador de glutamato/aspartato, também conhecido como EEAT1) e GLT-1 (transportador de glutamato, também conhecido como EEAT2). Estes são os dois mais importantes transportadores de Glu presentes no cérebro e sua função é removê-lo do espaço extracelular prevenindo sua alta concentração à valores neurotóxicos. GLAST e GLT-1 são transportadores de glutamato sódio-dependentes (GluTs) que dependem dos gradientes de sódio e potássio gerados principalmente pela Na^+ , K^+ -ATPase para gerar os gradientes iônicos que levam à captação de Glu, ou seja, há uma interação entre a Na^+ , K^+ -ATPase e os GluTs para modular a captação de Glu (ZHANG et al., 2015).

O Glu é um dos principais neurotransmissores envolvidos na formação da memória. Por meio da ligação com seus receptores ocorrem alterações neuronais e ativação de canais iônicos e mecanismos intracelulares, que resultam na síntese de proteínas e aumento da efetividade da transmissão de informações. Este processo é chamado de plasticidade sináptica, que parece ser o mecanismo pelo qual há a formação da memória (LAU; TYMIANSKI, 2010; MEHTA et al., 2013).

A Figura 1 mostra como ocorre a neurotransmissão glutamatérgica. O Glu é liberado na fenda sináptica através da fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica. Após a sua ação sobre os iGluR (NMDA, AMPA e KA) ou mGluR na membrana pós-sináptica, o Glu pode ser

removido a partir da fenda sináptica através de dois processos: recaptação aos terminais pré-sinápticos neuronais e captação pelas células gliais. Baixas concentrações de Glu são captadas pelas células gliais através dos EAATs. Nos astrócitos, o Glu captado pelas células gliais é convertido em glutamina (Gln) pela enzima glutamina sintase. Essa Gln é captada pelos neurônios pré-sinápticos e convertida novamente à Glu pela ação da glutaminase. No citoplasma, o Glu é então empacotado em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de glutamato (vGLUT).



Fonte: PINTO; RESENDE, 2014.

FIGURA 1 - Neurotransmissão glutamatérgica

2.3 Glutamato Monossódico

O glutamato monossódico (MSG) (Figura 2) é um dos aditivos alimentares mais utilizado do mundo e está presente em grande parte dos alimentos processados como realçador de sabor, pois aumenta sua palatabilidade (BEYREUTHER et al., 2007; HUSAROVA; OSTATNIKOVA, 2013). Sais de ácido glutâmico foram descobertos pela primeira vez em 1908, quando o professor Kikunae Ikeda, um cientista japonês, identificou o gosto único do *umami*, que significa “delicioso” em japonês, atribuído ao ácido glutâmico. Ele o extraiu e

identificou a partir do caldo preparado com algas marinhas *kombu* (IKEDA, 1909; JINAP; HAJEB, 2010).

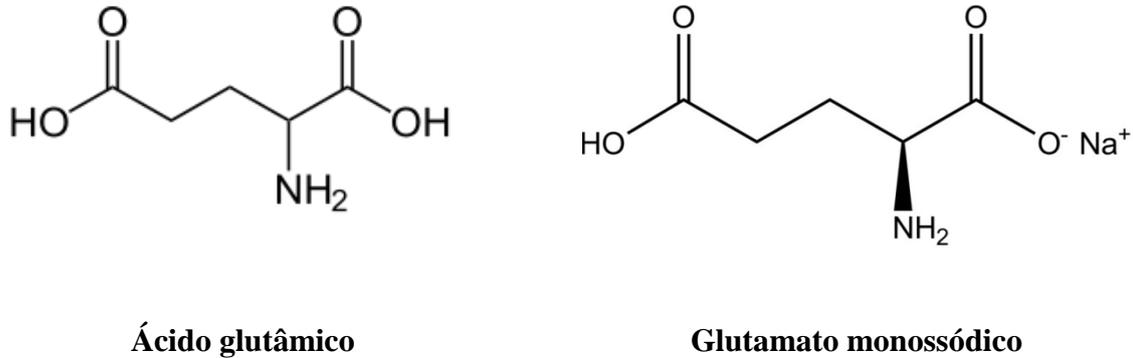


FIGURA 2 - Estruturas moleculares do ácido glutâmico e do glutamato monossódico

Diversos estudos têm evidenciado os efeitos tóxicos do MSG, o que tem levantado interesse no seu crescente consumo como intensificador de sabor. Efeitos neurotóxicos, obesidade e defeitos metabólicos, "síndrome do restaurante chinês" e efeitos prejudiciais aos órgãos sexuais são os mais discutidos na literatura devido a sua ingestão (HUSAROVA; OSTATNIKOVA, 2013). Já foi demonstrado que em roedores, a administração de altas doses de MSG durante os estágios iniciais do desenvolvimento do cérebro induz a destruição de sítios no hipotálamo, resultando em anormalidades neuroendócrinas (OLNEY, 1969; QUINES et al., 2014; ROSA et al., 2015). Em animais jovens (4-6 semanas) foram observadas alterações neurocomportamentais e acúmulo de β -amilóide no hipocampo após a administração de MSG (NARAYANAN et al., 2010; DIEF et al., 2014).

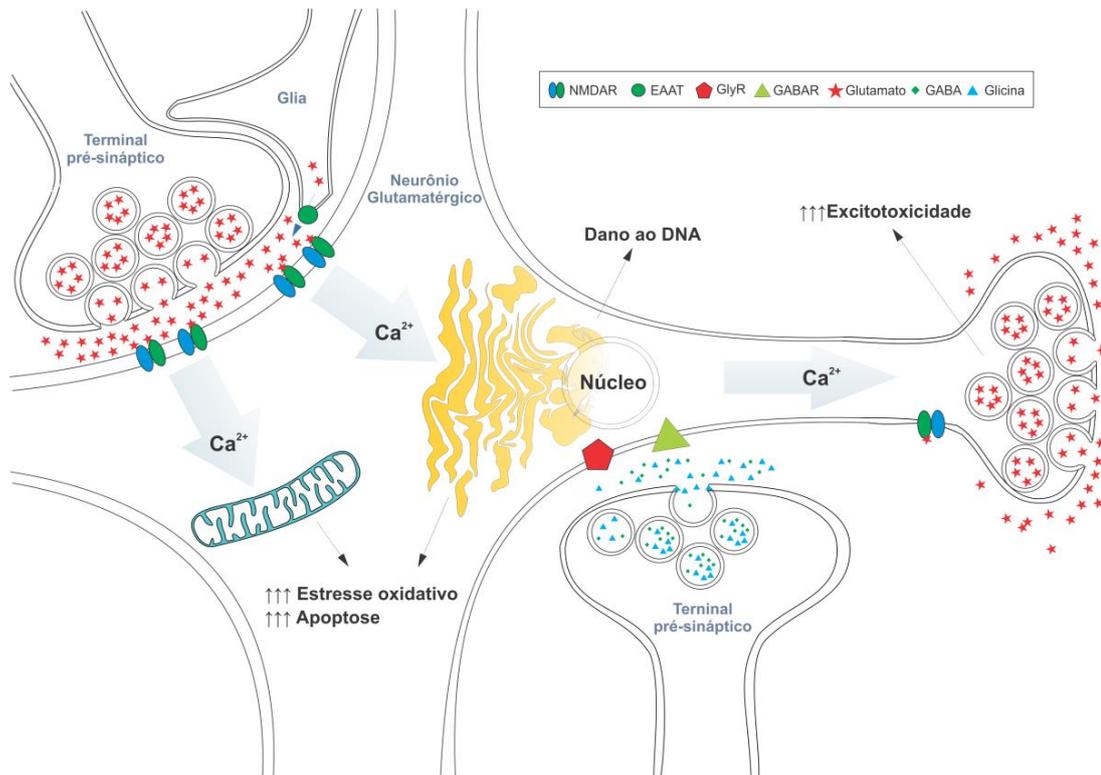
Embora vários agonistas glutamatérgicos específicos possam imitar os efeitos tóxicos do Glu, o MSG é possivelmente o agente mais comum que tem sido utilizado para caracterizar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na excitotoxicidade pelo Glu (MEHTA et al., 2013; ZHOU; DANBOLT, 2014). Ele atua através da ativação dos iGluRs e mGluRs, encontrados no SNC. A superativação desses receptores tem sido relacionada com a excitotoxicidade e morte neuronal (LAU; TYMIANSKI, 2010; MEHTA et al., 2013). Em muitos países, não existem limitações sobre a quantidade de MSG que pode ser adicionado ao alimento. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estabelece o limite *quantum satis*, ou seja, o limite máximo de uso é baseado na quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico desejado, desde que não altere a identidade e a genuinidade do alimento (BRASIL, 2010). Estima-se que em países industrializados, o consumo médio diário de MSG

por pessoa seja de 0,3 a 1,0 g, porém, essa quantidade depende do conteúdo de MSG nos alimentos e também das preferências individuais (GEHA et al., 2000).

2.4 Glutamato e o Sistema Nervoso Central

Em adultos, na maioria das regiões do cérebro, a captação plasmática de glutamato e outros aminoácidos excitatórios é limitada pela barreira hematoencefálica (BHE). O transporte de Glu através da BHE tem sido estudado através de ensaios de captação de células *in vitro* e métodos de perfusão *in vivo*. Os resultados demonstram que, em concentrações fisiológicas, o fluxo de glutamato a partir do plasma no cérebro é mediado por um sistema de transporte de alta afinidade na BHE. As concentrações plasmáticas de Glu flutuam durante o dia, como resultado de mudanças na dieta, metabolismo e *turnover* de proteína. Para atravessar a barreira, a maioria dos solutos deve ou se dissolver e difundir através das membranas celulares da barreira, ou ser transportados através de transportadores específicos na BHE. Para compensar a troca passiva limitada, as células da BHE contêm sistemas de transporte específicos que regulam o fluxo de solutos chave do sangue para o fluído intersticial cerebral e líquido e vice-versa. Acredita-se que, com uma grande dosagem sistêmica, alguma absorção de Glu ocorra no cérebro (SMITH, 2000).

Concentrações excessivas de Glu na fenda sináptica geram um grande influxo de Ca^{2+} através dos receptores NMDA. O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular gera acúmulo na mitocôndria, ativando os mecanismos intracelulares de excitotoxicidade que culminam em apoptose celular (Figura 3) (MEHTA et al., 2013). Também, o excesso de Ca^{2+} intracelular pode causar edema, lise celular e, conseqüentemente, maior liberação de Glu. A liberação exacerbada de Glu, por sua vez, gera a morte de outras células dando seqüência a um ciclo de degeneração no tecido e, como resultado de tal desregulação, há prejuízo das funções de aprendizagem e memória (SZYDLOWSKA; TYMIANSKI, 2010; NYAKAS et al., 2011).



Fonte: PINTO; RESENDE (2014)

FIGURA 3 - Excitotoxicidade em neurônios glutamatergicos

2.4.1 Glutamato Monossódico e Memória

Estudos recentes têm demonstrado prejuízos de aprendizagem e memória em animais expostos ao MSG. NARAYANAN et al. (2010) demonstraram em seu estudo que a administração de MSG levou a alterações neurocomportamentais em ratos jovens, com 4 a 6 semanas de idade. Os autores observaram que os animais que receberam MSG apresentaram a memória de curta e longa duração prejudicadas através da diminuição da latência de entrada no compartimento escuro. A administração concomitante de ácido ascórbico protegeu contra essas alterações.

DIEF et al. (2014) avaliaram o efeito do MSG no SNC de ratos com 5 semanas de idade através de duas vias de administração: oral e subcutânea. Foi observado que as duas vias induziram efeitos prejudiciais semelhantes ao SNC dos animais testados, como acúmulo da proteína β -amilóide no hipocampo, além da redução de AMPK e aumento dos níveis de Fas-ligante, um mediador de apoptose. Sabe-se que o acúmulo de β -amilóide é uma característica

fundamental da doença de Alzheimer, síndrome neurodegenerativa progressiva caracterizada principalmente pela perda de memória e deficiência intelectual (YAO et al., 2005; DIEF et al., 2014).

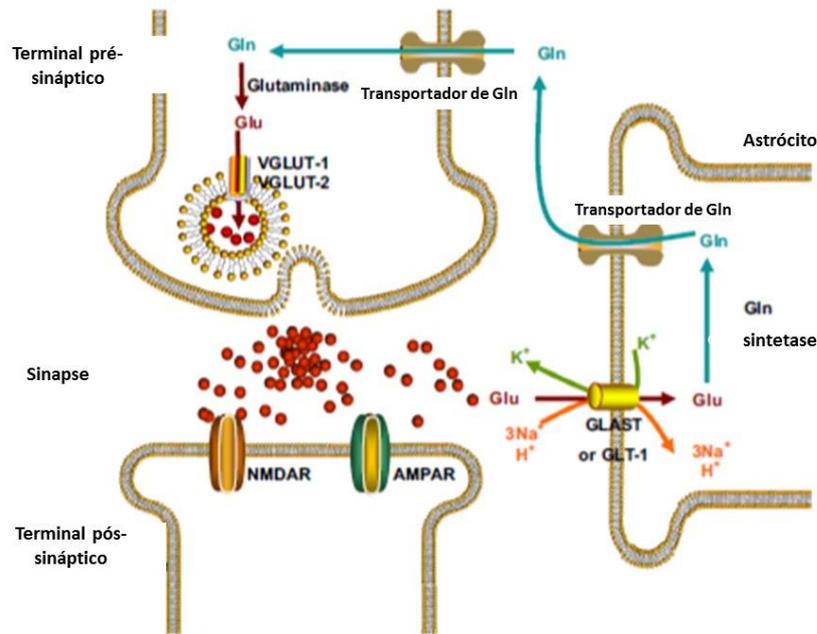
Outro estudo também avaliou os efeitos adversos de repetidas administrações de MSG na memória de ratos adultos. Seus resultados demonstraram que a exposição ao MSG prejudicou significativamente a memória de reconhecimento dos animais e, também, a memória de curto e longo prazo no labirinto aquático de Morris. Estes resultados foram acompanhados de uma diminuição dos níveis plasmáticos e cerebrais de triptofano (KHALIQ et al., 2015).

2.5 Na⁺, K⁺-ATPase

A Na⁺, K⁺-ATPase é um complexo proteico associado à membrana plasmática encontrado em células animais, que utiliza a energia liberada pela hidrólise de ATP para transportar Na⁺ e K⁺. Essa enzima converte a energia química resultante da hidrólise do ATP em ADP + fosfato, em trabalho mecânico para transportar três íons de Na⁺ para o meio extracelular e dois íons de K⁺ para o meio intracelular através da membrana plasmática (ZHANG et al., 2015) e, ela mantém o gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal (GAMARO et al., 2003). No SNC, a Na⁺, K⁺-ATPase contribui de forma significativa para a manutenção do gradiente eletroquímico através da membrana plasmática, potenciais de ação, bem como a modulação da liberação de neurotransmissores e sua captação. Consequentemente, uma diminuição na atividade da Na⁺, K⁺-ATPase afeta diretamente a sinalização de neurotransmissores, a atividade neuronal e, também o comportamento. Foi demonstrada uma correlação significativa entre a inibição da Na⁺, K⁺-ATPase e os déficits cognitivos em diversos modelos de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e Parkinson (LIMA et al., 2009).

Estudos demonstram que a Na⁺, K⁺-ATPase pode conduzir à captação de Glu nos astrócitos, ação que seria dependente da sua interação com os GluTs (ROSE et al., 2009; GENDA et al., 2011). Alguns autores sugerem que, *in vivo*, a Na⁺, K⁺-ATPase e o GLAST ou GLT-1 formam um complexo macromolecular e operam como uma unidade funcional para regular as sinapses glutamatérgicas (Figura 4) (CHOLET et al., 2002; ROSE et al., 2009). Os GluTs dependem criticamente do metabolismo energético e, em particular, da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase, assim, mudanças na atividade enzimática podem regular a captação de Glu via GluTs. Portanto,

a concentração extracelular de Glu é controlada através da sua captação pelos GluTs nos astrócitos, e é dependente dos gradientes de Na^+ e K^+ através da membrana plasmática. A eficácia da Na^+ , K^+ -ATPase na regulação da captação de Glu pelos astrócitos tem sido sugerida através da sua interação com os GluTs, dessa forma a Na^+ , K^+ -ATPase torna-se um importante modulador da captação de Glu via GluTs, mostrando-se um alvo potencial para a proteção contra a neurotoxicidade Glu-induzida (ZHANG et al., 2015).



Fonte: Adaptado de ZHANG et al., 2015

FIGURA 4 – Ciclo Glu-Gln entre neurônios e astrócitos

2.6 Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável por regular os níveis de acetilcolina (ACh) na fenda sináptica. A ACh é um neurotransmissor notavelmente envolvido nos processos de aprendizagem, memória e atenção, participando na codificação de novas informações (ROBINSON et al., 2011). A enzima AChE responde a vários insultos, incluindo o estresse oxidativo, evento que tem sido relacionado com a patogênese e progressão de uma variedade de doenças do SNC (OZKUL et al., 2007). Alterações no sistema colinérgico foram documentadas em pacientes com doenças neurodegenerativas, como a DA e, algumas

evidências demonstram uma correlação positiva entre a intensidade dos sintomas clínicos de demência e a redução dos marcadores corticais de atividade colinérgica, como os níveis de ACh (GSELL et al., 2004).

Estudos têm demonstrado um aumento na atividade dessa enzima em regiões próximas às placas amilóides em todos estágios da DA, incluindo nos estágios iniciais da doença e, ainda, tem sido observado que animais tratados com MSG têm apresentado aumento significativo nos níveis da AChE (MADHAVADAS et al., 2014). Deste modo, esta enzima tem sido alvo para as estratégias terapêuticas emergentes no tratamento de distúrbios cognitivos, através da inibição da sua atividade, por exemplo (SHEN et al., 2011).

2.7 Estresse Oxidativo

Evidências têm demonstrado que a excitotoxicidade está relacionada com a geração de radicais livres produzidos como consequência da ativação de enzimas dependentes do cálcio, como fosfolipase A₂, óxido nítrico sintase e xantina oxidase e, pela disfunção oxidativa mitocondrial (METHA et al., 2013). O SNC é especialmente vulnerável aos danos oxidativos, como resultado da elevada taxa de consumo de oxigênio pelo cérebro, seu grande conteúdo lipídico, elevados níveis de ferro e cobre, e a relativa escassez de enzimas antioxidantes em comparação a outros tecidos (HALLIWELL, 2006). O estresse oxidativo (EO) é uma característica fundamental e precoce em doenças neurodegenerativas. Durante o metabolismo basal ocorre a produção constante de espécies reativas (ER), que são geradas, principalmente, durante a respiração celular mitocondrial. A geração de ER é acompanhada da sua contínua inativação pela ação de antioxidantes, visando manter a integridade estrutural e funcional das biomoléculas. Quando há um desequilíbrio entre a formação de ERs e as defesas antioxidantes celulares, ocorre o EO. Essa condição pode acontecer devido um aumento da produção de ER ou por uma diminuição das defesas antioxidantes, ou ambos (HALLIWELL, 2011).

As ER são intermediários com grande poder de oxidação provenientes do metabolismo fisiológico do oxigênio e nitrogênio, produzidas por alguma disfunção biológica. Espécies que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência são chamadas de radicais livres e são altamente reativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Todavia, o termo radical livre não é o mais adequado para designar todos os agentes reativos, pois alguns destes não possuem elétrons desemparelhados, como é o caso do peróxido de hidrogênio

(H₂O₂). As EROs mais estudadas são o radical ânion superóxido (O₂^{-•}), radical hidroxila (OH[•]) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), mas há também aquelas provenientes de moléculas orgânicas como os radicais peroxila (RO₂[•]) e alcoxila (RO[•]), e peróxidos orgânicos (ROOH) (SIES, 1991).

Os agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células são os antioxidantes. Estes agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Dentre as principais enzimas responsáveis pela defesa antioxidante endógena podemos destacar a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx). Já entre as defesas antioxidantes não-enzimáticas destaca-se a glutathione (GSH), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina) e ácido diidrolipóico. Há, ainda, os antioxidantes exógenos, que podem ser fornecidos através da dieta, como o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), o β -caroteno (pró-vitamina A), minerais antioxidantes (selênio e zinco) e os flavonoides (BIANCHI; ANTUNES, 1999; HALLIWELL, 2000; 2006). A estimulação excessiva dos receptores de glutamato parece ser o principal mediador para o EO intracelular (KUMAR et al., 2011). Assim, estudos têm demonstrado que a administração de MSG leva a um aumento dos níveis de ER nos animais expostos (RAMANATHAN et al., 2007; SHIVASHARAN et al., 2013; SWAMY et al., 2013).

2.8 Compostos orgânicos de selênio

O Selênio (Se) foi descoberto em 1817 e por muito tempo foi considerado tóxico para humanos e animais. Porém, estudos posteriores demonstraram que este elemento apresenta um grande número de funções biológicas, sendo a mais importante o seu potencial antioxidante. Esta atividade benéfica pode ser atribuída a sua presença no sítio ativo de enzimas que possuem atividade antioxidante, como a GPx e a tioredoxina redutase (PAPP et al., 2007).

O Se é um elemento traço essencial na dieta, sendo encontrado em alimentos como a castanha-do-pará, alho, cebola, brócolis, cogumelos, cereais, pescados, ovos e carnes (DUMONT et al., 2006). A recomendação de ingestão diária de Se varia entre 20-55 μ g, de acordo com a faixa etária (IOM, 2006). Foi estabelecido que esse elemento é eficaz na

prevenção de uma série de condições degenerativas, incluindo doenças inflamatórias e neurológicas, como a DA (XIONG et al., 2007; LOEF et al., 2011).

Nas últimas décadas têm aumentado o interesse pelo estudo dos compostos orgânicos de Se, uma vez que estes demonstraram ter atividades biológicas e promissoras propriedades farmacológicas, como alta capacidade antioxidante, por exemplo. Estudos têm relatado que os compostos orgânicos de Se melhoram a função da memória em roedores, sem induzir neurotoxicidade (ROSA et al., 2003; STANGHERLIN et al., 2008; SOUZA et al., 2010). Entre esses compostos podemos citar: o disseleneto de difenila [(PhSe)₂], o ebselen e o disseleneto de *p*-metoxi fenila [(MeOPhSe)₂]. Além da propriedade antioxidante, esses compostos exibem ação antinociceptiva (SAVEGNAGO et al., 2007), neuroprotetora (GHISLENI et al., 2003; PINTON et al., 2011), hepatoprotetora (BORGES et al., 2008) e anticarcinogênica (DE VARGAS BARBOSA et al., 2008).

O Ebselen, demonstrou efeito neuroprotetor em diferentes modelos experimentais. Foi demonstrado que ele reduz a citotoxicidade induzida pelo Glu em cultura primária de neurônios através da inibição da ativação dos receptores glutamatérgicos NMDAR (PORCIUNCULA et al., 2001). Já o (PhSe)₂ demonstrou efeito preventivo contra o prejuízo de memória induzido pela escopolamina em camundongos (SOUZA et al., 2010) e, ainda, melhorou o desempenho cognitivo de ratos no labirinto aquático de Morris (STANGHERLIN et al., 2008) e a memória de longa duração no teste de reconhecimento de objetos (ROSA et al., 2003). O (MeOPhSe)₂ por sua vez, demonstrou efeitos neuroprotetores revertendo os prejuízos de aprendizagem e memória em um modelo de demência esporádica do tipo-Alzheimer induzida pela estreptozotocina em camundongos (PINTON et al., 2010; PINTON et al., 2011; PINTON et al., 2013).

2.8.1 Selenofuranosídeo

O Selenofuranosídeo (Figura 5) é um composto orgânico de Se, constituído por uma molécula simples de carboidrato contendo uma molécula de Se. Estudo realizado por Spiazzi, Soares et al. (2015) demonstrou a capacidade neuroprotetora do selenofuranosídeo em um modelo de demência esporádica do tipo-Alzheimer induzido pela injeção intracerebroventricular de Aβ₂₅₋₃₅ em camundongos. Já Vargas, Soares et al. (2013),

demonstraram que o selenofuranosídeo foi capaz de restaurar a atividade da enzima δ -ALA-D de ovário, em camundongos Swiss (fêmeas adultas), após exposição aguda ao Cd. Entretanto, novos estudos são necessários para compreender os mecanismos envolvidos nas ações terapêuticas deste composto.

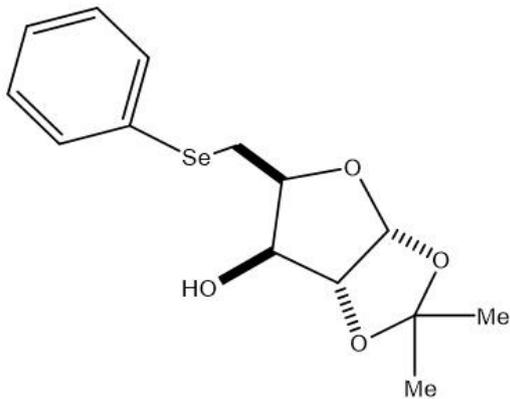


FIGURA 5 - Estrutura do selenofuranosídeo

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor do selenofuranosídeo sobre o prejuízo à memória induzido pela administração aguda de MSG em ratos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do MSG sobre a memória em ratos tratados ou não com o selenofuranosídeo através dos testes comportamentais: open-field e esquiva inibitória;
- Avaliar a atividade das enzimas Na⁺, K⁺-ATPase e AChE no hipocampo e córtex, após a administração de MSG e selenofuranosídeo;
- Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo e córtex, após a administração de MSG e selenofuranosídeo;
- Avaliar os parâmetros de estresse oxidativo nos tecidos periféricos (fígado e rim), após a administração de MSG e selenofuranosídeo;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos sanguíneos, após a administração de MSG e selenofuranosídeo .

4 MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências encontram-se no próprio manuscrito. O mesmo está apresentado na forma que será submetido ao periódico *Physiology and Behavior*.

5 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados apresentados nesta dissertação pode-se concluir que:

- O prejuízo à memória longa duração induzido pela administração aguda de MSG envolve redução na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase no hipocampo de ratos;
- A administração de selenofuranosídeo protegeu contra o prejuízo na memória de longa duração induzido pelo MSG, bem como a redução na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase;
- O prejuízo na memória de longa duração observado no presente estudo não envolveu o estresse oxidativo, nem a enzima AChE;
- A administração aguda de MSG e selenofuranosídeo não causou toxicidade periférica, demonstrado por meio da ausência de alterações nos marcadores de dano hepático e de estresse oxidativo no fígado e rins.

Assim sendo, este trabalho demonstra que o selenofuranosídeo é uma alternativa promissora para o estudo de drogas no tratamento de desordens de memória. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar quais os possíveis mecanismos de ação do selenofuranosídeo, e sobre quais outros parâmetros em nível de sistema nervoso central ele pode estar atuando.

REFERÊNCIAS

- BEYREUTHER, K. et al. Consensus meeting: monosodium glutamate - an update. **Eur J Clin Nutr**, v. 61, n. 3, p. 304-13, 2007.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BORGES, L. P. et al. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. **Chem Biol Interact**, v. 171, n. 1, p. 15-25, 2008.
- BRASIL. **Resolução nº 45, de 3 de novembro de 2010. Regulamento técnico sobre aditivos alimentares autorizados segundo as Boas Práticas de Fabricação.** SANITÁRIA, A. N. D. V. Diário Oficial da União: 63-68 p. 2010.
- BRUNELLI, M. et al. Neurobiological principles of learning and memory. **Arch Ital Biol**, v. 135, n. 1, p. 15-36, 1997.
- CAMMAROTA, M. et al. Parallel memory processing by the CA1 region of the dorsal hippocampus and the basolateral amygdala. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 30, p. 10279-84, 2008.
- CHOLET, N. et al. Similar perisynaptic glial localization for the Na⁺,K⁺-ATPase alpha 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. **Cereb Cortex**, v. 12, n. 5, p. 515-25, 2002.
- DE VARGAS BARBOSA, N. B. et al. Diphenyl diselenide supplementation delays the development of N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors. **Arch Toxicol**, v. 82, n. 9, p. 655-63, 2008.
- DIEF, A. E. et al. Monosodium glutamate neurotoxicity increases beta amyloid in the rat hippocampus: a potential role for cyclic AMP protein kinase. **Neurotoxicology**, v. 42, p. 76-82, 2014.
- DUDAI, Y. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? **Annu Rev Psychol**, v. 55, p. 51-86, 2004.
- DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, n. 7, p. 1304-23, 2006.
- FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- GAMARO, G. D. et al. Reduction of hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity in rats subjected to an experimental model of depression. **Neurochem Res**, v. 28, n. 9, p. 1339-44, 2003.

GEHA, R. S. et al. Review of alleged reaction to monosodium glutamate and outcome of a multicenter double-blind placebo-controlled study. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1058S-62S, 2000.

GENDA, E. N. et al. Co-compartmentalization of the astroglial glutamate transporter, GLT-1, with glycolytic enzymes and mitochondria. **J Neurosci**, v. 31, n. 50, p. 18275-88, 2011.

GHISLENI, G. et al. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunoreactivity. **Brain Res**, v. 986, n. 1-2, p. 196-9, 2003.

GSELL, W.; JUNGKUNZ, G.; RIEDERER, P. Functional neurochemistry of Alzheimer's disease. **Curr Pharm Des**, v. 10, n. 3, p. 265-93, 2004.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179-80, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - quo vadis? **Trends Pharmacol Sci**, v. 32, n. 3, p. 125-30, 2011.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1634-58, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, n. 2, p. 231-55, 2004.

HUSAROVA, V.; OSTATNIKOVA, D. Monosodium glutamate toxic effects and their implications for human intake: A review. **JMED Research**, v. 2013, 2013.

IKEDA, K. On a new seasoning. **Journal of Tokyo Chemistry Society**, v. 30, p. 820-836, 1909.

IOM. **Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements**. MEDICINE, I. O. Washington, D.C.: THE NATIONAL ACADEMIES PRESS 2006.

IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635-6, 1998.

IZQUIERDO, I. et al. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends Neurosci**, v. 29, n. 9, p. 496-505, 2006.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav Pharmacol**, v. 11, n. 7-8, p. 517-34, 2000.

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, n. 3, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I. A. et al. Memória: tipos e mecanismos – achados recentes. **REVISTA USP**, v. 98, p. 9-16, 2013.

JINAP, S.; HAJEB, P. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. **Appetite**, v. 55, n. 1, p. 1-10, 2010.

KHALIQ, S. et al. Repeated Monosodium Glutamate (Chinese Salt) Administration Impaired Memory Functions in Rats: Relationship with Decreased Plasma and Brain Tryptophan. **J.Chem.Soc.Pak.**, v. 37, n. 02, p. 390-394, 2015.

LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflugers Arch**, v. 460, n. 2, p. 525-42, 2010.

LIMA, F. D. et al. Adaptation to oxidative challenge induced by chronic physical exercise prevents Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition after traumatic brain injury. **Brain Res**, v. 1279, p. 147-55, 2009.

LOEF, M.; SCHRAUZER, G. N.; WALACH, H. Selenium and Alzheimer's disease: a systematic review. **J Alzheimers Dis**, v. 26, n. 1, p. 81-104, 2011.

MEHTA, A. et al. Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. **Eur J Pharmacol**, v. 698, n. 1-3, p. 6-18, 2013.

NARAYANAN, S. N. et al. Effect of ascorbic acid on the monosodium glutamate-induced neurobehavioral changes in periadolescent rats. **Bratisl Lek Listy**, v. 111, n. 5, p. 247-52, 2010.

NYAKAS, C. et al. The basal forebrain cholinergic system in aging and dementia. Rescuing cholinergic neurons from neurotoxic amyloid-beta₄₂ with memantine. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 2, p. 594-603, 2011.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 3880, p. 719-21, 1969.

OZKUL, A. et al. Oxidative stress in acute ischemic stroke. **J Clin Neurosci**, v. 14, n. 11, p. 1062-6, 2007.

PAPP, L. V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 7, p. 775-806, 2007.

PINTO, M. C. X.; RESENDE, R. R. Excitotoxicidade e doenças neurológicas. **Nanocell News**, v. 2, n. 04, 2014.

PINTON, S. et al. Neuroprotector effect of p,p'-methoxyl-diphenyl diselenide in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type in mice: contribution of antioxidant mechanism. **Cell Biochem Funct**, v. 29, n. 3, p. 235-43, 2011.

PINTON, S. et al. Organoselenium improves memory decline in mice: involvement of acetylcholinesterase activity. **Neurosci Lett**, v. 472, n. 1, p. 56-60, 2010.

- PINTON, S. et al. p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide prevents neurodegeneration and glial cell activation induced by streptozotocin in rats. **J Alzheimers Dis**, v. 33, n. 1, p. 133-44, 2013.
- PORCIUNCULA, L. O. et al. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. **Neurosci Lett**, v. 299, n. 3, p. 217-20, 2001.
- QUINES, C. B. et al. Monosodium glutamate, a food additive, induces depressive-like and anxiogenic-like behaviors in young rats. **Life Sci**, v. 107, n. 1-2, p. 27-31, 2014.
- RAMANATHAN, M. et al. Neuroprotective evaluation of standardized extract of *Centella asiatica* in monosodium glutamate treated rats. **Indian J Exp Biol**, v. 45, n. 5, p. 425-31, 2007.
- RANGAN, C.; BARCELOUX, D. G. Food additives and sensitivities. **Dis Mon**, v. 55, n. 5, p. 292-311, 2009.
- ROBINSON, L.; PLATT, B.; RIEDEL, G. Involvement of the cholinergic system in conditioning and perceptual memory. **Behav Brain Res**, v. 221, n. 2, p. 443-65, 2011.
- ROSA, R. M. et al. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. **Neurosci Lett**, v. 341, n. 3, p. 217-20, 2003.
- ROSA, S. G. et al. Antinociceptive action of diphenyl diselenide in the nociception induced by neonatal administration of monosodium glutamate in rats. **Eur J Pharmacol**, v. 758, p. 64-71, 2015.
- ROSE, E. M. et al. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. **J Neurosci**, v. 29, n. 25, p. 8143-55, 2009.
- SAVEGNAGO, L. et al. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. **Eur J Pharmacol**, v. 555, n. 2-3, p. 129-38, 2007.
- SCURI, R. et al. Inhibition of Na⁺/K⁺ ATPase potentiates synaptic transmission in tactile sensory neurons of the leech. **Eur J Neurosci**, v. 25, n. 1, p. 159-67, 2007.
- SHIVASHARAN, B. D. et al. Protective Effect of *Calendula officinalis* L. Flowers Against Monosodium Glutamate Induced Oxidative Stress and Excitotoxic Brain Damage in Rats. **Indian J Clin Biochem**, v. 28, n. 3, p. 292-8, 2013.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med**, v. 91, n. 3C, p. 31S-38S, 1991.
- SMITH, Q. R. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1016S-22S, 2000.
- SOUZA, A. C. et al. Diphenyl diselenide improves scopolamine-induced memory impairment in mice. **Behav Pharmacol**, v. 21, n. 5-6, p. 556-62, 2010.

SPIAZZI, C. C. et al. Selenofuranoside Ameliorates Memory Loss in Alzheimer-Like Sporadic Dementia: AChE Activity, Oxidative Stress, and Inflammation Involvement. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2015.

SQUIRE, L. R. Memory systems of the brain: a brief history and current perspective. **Neurobiol Learn Mem**, v. 82, n. 3, p. 171-7, 2004.

STANGHERLIN, E. C. et al. Sub-chronical exposure to diphenyl diselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats. **Brain Res**, v. 1201, p. 106-13, 2008.

SWAMY, A. H. et al. Neuroprotective Activity of Pongamia pinnata in Monosodium Glutamate-induced Neurotoxicity in Rats. **Indian J Pharm Sci**, v. 75, n. 6, p. 657-63, 2013.

SZYDLOWSKA, K.; TYMIANSKI, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. **Cell Calcium**, v. 47, n. 2, p. 122-9, 2010.

WYSE, A. T. et al. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus. **Physiol Behav**, v. 80, n. 4, p. 475-9, 2004.

XIONG, S. et al. Seleno-L-methionine protects against beta-amyloid and iron/hydrogen peroxide-mediated neuron death. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 4, p. 457-67, 2007.

YAO, M.; NGUYEN, T. V.; PIKE, C. J. Beta-amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. . **J Neurosci**, v. 25, n. 5, p. 1149-1158, 2005.

ZHANG, L. N. et al. Glutamate Transporters/Na, K-ATPase Involving in the Neuroprotective Effect as a Potential Regulatory Target of Glutamate Uptake. **Mol Neurobiol**, 2015.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 121, n. 8, p. 799-817, 2014.

ANEXO A – Protocolo de aprovação do projeto pelo CEUA-UNIPAMPA

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO
DE ANIMAIS EM PESQUISA**

Número de protocolo da CEUA: **022/2015**

Título: **Avaliação do efeito neuroprotetor do seleno-furanosídeo na neurotoxicidade induzida por glutamato-monossódico**

Data da aprovação: **01/07/2015**

Período de vigência do projeto: De: **07/2015** Até: **07/2018**

Pesquisador: **Marina Prigol**

Campus: **Itaqui**

Telefone: **(55) 96447424**

E-mail: **marinaprigol@gmail.com**

Marcela Dal Pozzo
Médico Veterinário

Coordenadora Pro Tempore da CEUA/UNIPAMPA