

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

**EFEITO DO TRATAMENTO *IN VIVO* COM DITELURETO DE DIFENILA**  
**SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO E SOBRE A**  
**ATIVIDADE DA  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase EM CÓRTEX CEREBRAL E/OU HIPOCAMPO**  
**DE RATOS JOVENS**

**Luana Heimfarth**

**Porto Alegre, RS, Brasil**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**EFEITO DO TRATAMENTO *IN VIVO* COM DITELURETO DE DIFENILA**  
**SOBRE A FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO E SOBRE A**  
**ATIVIDADE DA Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase EM CÓRTEX CEREBRAL E/OU HIPOCAMPO**  
**DE RATOS JOVENS**

**Luana Heimfarth**

**Orientadora: Profa. Dra. Regina Pessoa Pureur**

**Co-orientador: Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

**Porto Alegre, RS, Brasil**

**2007**

Toda a nossa ciência,  
comparada com a realidade, é  
primitiva e infantil - e, no  
entanto, é a coisa mais preciosa  
que temos.

**Albert Einstein**

## AGRADECIMENTOS

A Regina pela amizade, orientação e dedicação, que foram fundamentais para a realização desse trabalho.

Ao João, pela ajuda durante a realização desse trabalho.

A Samanta, Priscila e Ariane, pela amizade, apoio e companheirismo de todas as horas.

As bolsistas de iniciação científica Bruna, Camila, Lilian, Luíza e Sofia, pela amizade, apoio e dedicação nesse tempo que trabalhamos juntas.

Aos meus amigos de Novo Hamburgo, em especial a Jú e a Marione que alegraram e compartilharam bons momentos da minha vida.

Aos amigos da faculdade de Farmácia.

Aos meus tios e primos, que de alguma maneira contribuíram para o meu crescimento pessoal.

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Bioquímica que de alguma forma me ajudaram a desenvolver esse trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A Francine e a Carol pela amizade.

Finalmente, agradeço com todo o meu carinho àqueles que desde o início de minha vida sempre estiveram comigo, me apoiando, ensinando e não me deixando desistir no primeiro obstáculo: meu pai Celso, minha mãe Carmen e meus irmãos Tales e Tobias. Obrigada por tudo, eu não seria o que sou hoje sem o apoio, amizade e amor de vocês.

# ÍNDICE

## PARTE I

RESUMO	2
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	4
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. CITOESQUELETO	5
1.1.1. Filamentos Intermediários	6
1.1.1.1. Neurofilamentos	7
1.1.1.2. Proteína Glial Fibrilar Ácida	8
1.1.1.3. Vimentina	9
1.2. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL	9
1.2.1. Fosforilação dos filamentos intermediários	11
1.3. COMPOSTOS ORGANOCALCOGÊNIOS	12
1.3.1. Selênio	13
1.3.1.1. Disseleneto de Difenila	13
1.3.2. Telúrio	13
1.3.2.1. Ditelureto de Difenila	14
1.4. $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPASE	16
2. OBJETIVO	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17

## PARTE II

1. ARTIGO - Effects of in vivo treatment with diphenyl diteluride on the phosphorylation of cytoskeletal proteins and Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase activity in cerebral cortex and hippocampus of rats.	19
--	----

## PARTE III

1. DISCUSSÃO	59
2. CONCLUSÃO	67
2.1. CONCLUSÃO GERAL	67
2.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS	67
3. PERSPECTIVAS	69
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
5. ANEXOS	88
5.1. LISTA DE FIGURAS	88

# PARTE I



## RESUMO

O telúrio é um elemento raro usado na indústria eletrônica como componente industrial de muitas ligas. Tanto as formas orgânicas quanto as inorgânicas do telúrio são altamente tóxicas para o SNC de roedores. Neste trabalho, nós inicialmente realizamos uma curva de dose, através de uma única administração subcutânea do composto orgânico de telúrio, ditelureto de difenila, em ratos de 15 dias de idade, estabelecendo a perda de massa corporal como critério de toxicidade do composto utilizado. A partir disso, o objetivo principal do nosso trabalho foi investigar o efeito de uma única administração subcutânea do ditelureto de difenila sobre a fosforilação dos filamentos intermediários (FI) de córtex cerebral e hipocampo de ratos Wistar jovens (15 dias de idade), 1, 3 ou 6 dias após a exposição à droga. Verificamos também a capacidade do composto orgânico de selênio, o disseleneto de difenila de reverter esse efeito. Além disso, também determinamos o efeito do tratamento *in vivo* com o ditelureto de difenila sobre a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase.

Os resultados obtidos mostraram que nos dias 3 e 6 após a injeção da droga, os animais injetados com 0,3  $\mu\text{mol/Kg}$  de peso corporal, ou doses maiores da neurotoxina, apresentaram uma perda significativa de massa corporal, quando comparados com os animais controles. Com base nesses dados, a concentração de 0,3  $\mu\text{mol/Kg}$  de peso corporal foi escolhida para a realização dos estudos posteriores. Nesse período ocorreu também um aumento da fosforilação dos neurofilamentos (FI neuronais), da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e da vimentina (FI gliais), no córtex cerebral dos ratos. O efeito do ditelureto de difenila sobre a fosforilação dos FI em córtex cerebral foi acompanhado por um aumento do imunocontéudo das proteínas NF-M, NF-L e GFAP na fração citoesquelética, sugerindo um aumento de polimerização destas proteínas. Por outro lado, o aumento do imunocontéudo da NF-L e GFAP no homogeneizado total 3 dias após a administração do ditelureto de difenila, é compatível com um aumento de expressão dessas proteínas. Porém, 6 dias após a injeção do composto verificou-se apenas um aumento do imunocontéudo da GFAP na fração citoesquelética, assim como da subunidade de alto peso molecular dos neurofilamentos (NF-H) e da GFAP no homogeneizado total de córtex cerebral. Por outro lado, no hipocampo, ocorreu um aumento de fosforilação apenas da GFAP e da vimentina, proteínas típicas de astrócitos, sendo que esse efeito só foi observado no sexto dia após a injeção da neurotoxina. Esse efeito foi acompanhado por um aumento do imunocontéudo da GFAP na fração citoesquelética 6 dias após a exposição ao ditelureto de difenila. O efeito sobre a fosforilação das proteínas do citoesqueleto foi completamente prevenido pelo disseleneto de difenila (5  $\mu\text{mol/Kg}$  de peso corporal) injetado uma única vez, 24 h após a administração do ditelureto de difenila. Além disso, também demonstramos nesse trabalho que, ele é capaz de inibir a atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 6 dias após a administração da droga.

Nossos resultados mostraram, portanto, que o ditelureto de difenila, quando administrado de forma aguda em ratos jovens, é capaz de aumentar a expressão de proteínas de FI e de afetar o sistema fosforilante associado a essas proteínas. Os dados mostraram ainda que o aparecimento desses efeitos tem uma latência de 3 a 6 dias após a injeção da toxina e indicaram que o córtex cerebral é mais sensível do que o hipocampo aos efeitos do composto orgânico do telúrio. Além disso, o ditelureto de difenila é capaz de inibir a enzima  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase cortical, reforçando a susceptibilidade do córtex cerebral à ação desta neurotoxina. Mostramos ainda neste trabalho, que o aumento de fosforilação das proteínas de FIs pode ser prevenido pelo disseleneto de difenila. Com base nos resultados obtidos, pode-se supor que as alterações no citoesqueleto e a inibição da atividade da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase em células corticais podem estar envolvidas com a neurotoxicidade desse composto.

## ABSTRACT

Tellurium is a rare element used as an industrial component of many alloys and in the electronic industry. This element also is one important intermediate and/or reagent in organic synthesis. Inorganic and organic tellurium compounds are highly toxic to the CNS of rodents. In this work we initially established the toxic dose and the time-action characteristics of diphenyl ditelluride acutely injected using body weight measurements as the end point of toxicity. Considering these findings, the aim of this work was to investigate the effect of a single subcutaneous injection of organic tellurium compounds, diphenyl ditelluride, on the intermediate filament (IF) phosphorylation in cerebral cortex and hippocampus from young Wistar rats (15 day-old), 1, 3 or 6 days after injection. We also investigated if diphenyl diselenide would be able to prevent this effect. Furthermore, we verified the effect of *in vivo* treatment with diphenyl ditelluride on  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity.

Results showed that at days 3 and 6 animals injected with 0.3  $\mu\text{mol/Kg}$  body weight or higher doses of diphenyl ditelluride presented loss of body mass when compared with control animals. Considering this finding, we have chosen the concentration of 0.3  $\mu\text{mol/Kg}$  body weight for the next experiments. We observed an hyperphosphorylation of neurofilaments (the neuronal IF) and of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and of vimentin (Vim) (astrocyte IFs) in cerebral cortex. The effect of diphenyl ditelluride 3 days of injection on IF phosphorylation was accompanied by an increased NF-M, NF-L and GFAP immunoccontent in IF-associated cytoskeletal fraction, suggesting an increase in protein polymerization. Otherwise, the stimulated GFAP, NF-L immunoreactivity in tissue homogenate suggests an increased protein synthesis. However, 6 days after the neurotoxin administration, only GFAP immunoccontent increased in IF-associated cytoskeletal fraction, while GFAP and NF-H immunoreactivity was stimulated in tissue homogenate from cerebral cortex. On the other hand, in hippocampus, we observed that astrocyte IF (GFAP and Vimentin) hyperphosphorylation was accompanied by increased immunoccontent of these proteins in cytoskeletal fraction at day 6 after tellurium injection. The cortical IF hyperphosphorylation induced by diphenyl ditelluride, was totally prevented by a single subcutaneous injection of diphenyl diselenide (5 $\mu\text{mol/kg}$  body weight) 24h after diphenyl ditelluride administration. We also showed that beyond the effects of the *in vivo* treatment with diphenyl ditelluride on the cytoskeleton of cortical cells, this neurotoxin inhibited  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity at day 6 after drug injection.

So, our results showed that a single subcutaneous injection of  $(\text{PheTe})_2$  in young rats is able to stimulate the phosphorylation and expression of IF proteins. Moreover, our data demonstrated that effects of diphenyl ditelluride were time- and brain structure-dependent. We also verified in this work that cerebral cortex is more susceptible than hippocampus to neurotoxin injury. In addition, the diphenyl ditelluride was also able to inhibit the  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity. We showed also in this work that cortical IF hyperphosphorylation induced by diphenyl ditelluride was totally prevented by diphenyl diselenide. Therefore, we can suppose that the observed alterations in cytoskeleton and the inhibition of the activity  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  in cortical cells may be related with the neurotoxicity of this substance.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPC	Adenosina 5`-monofosfato cíclico
ATP	Adenosina 5`-trifosfato
FI	Filamento Intermediário
GFAP	Proteína Glial Fibrilar Ácida
(H <sub>2</sub> Te)	Telureto de hidrogênio
MT	Microtúbulo
NF	Neurofilamento
NF-H	Subunidade protéica de 200 kDa dos neurofilamentos
NF-L	Subunidade protéica de 68 kDa dos neurofilamentos
NF-M	Subunidade protéica de 150 kDa dos neurofilamentos
(PheSe) <sub>2</sub>	Disseleneto de Difenila
(PheTe) <sub>2</sub>	Ditelureto de Difenila
SNC	Sistema Nervoso Central
Vim	Vimentina

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CITOESQUELETO

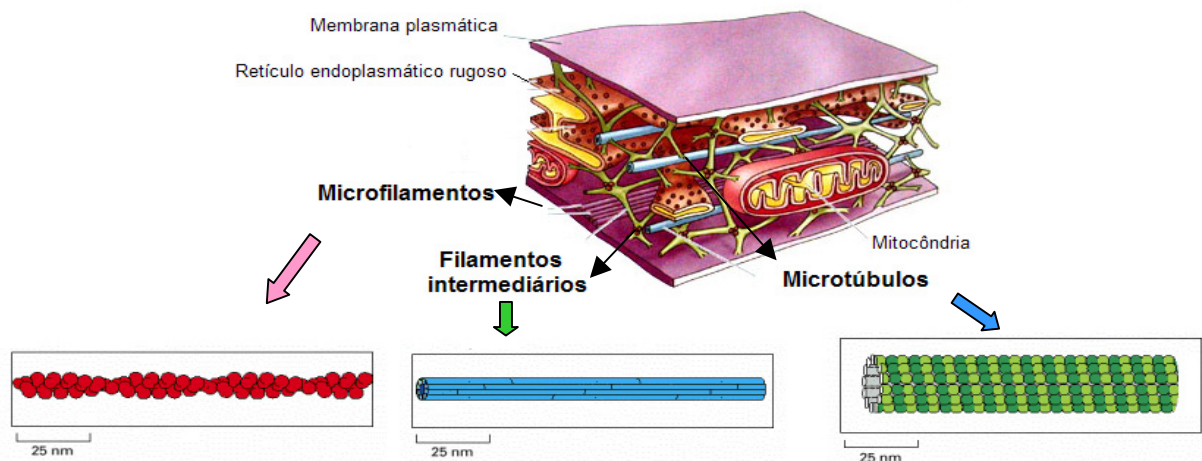
O citoesqueleto é uma rede complexa de filamentos protéicos que se estendem por todo o citoplasma da célula, formando uma estrutura altamente dinâmica que se reorganiza continuamente sempre que a célula altera sua forma, se divide ou responde ao ambiente. O citoesqueleto é responsável direto por movimentos tais como, deslocamento das células sobre o substrato e contração muscular. Ele também fornece a maquinaria necessária para movimentos intracelulares e é responsável pela organização espacial do citoplasma de células eucarióticas (Alberts *et al.*, 2002).

As proteínas do citoesqueleto têm papel fundamental na criação e manutenção da forma celular de neurônios e astrócitos, participam da manutenção do calibre axonal, bem como do transporte de organelas e substâncias envolvidas na transmissão sináptica (Kirkpatrick & Brady, 1999; Ackerley, 2000). Por outro lado, várias doenças neurodegenerativas e distúrbios psiquiátricos estão associados com alterações no citoesqueleto neuronal (Hirano, 1991; Lariviere & Julien, 2004).

Essa estrutura é um importante alvo de mecanismos de transmissão de sinais a partir de receptores de membrana plasmática, levando a uma resposta celular apropriada. Além disso, está envolvida na organização e reorganização dos receptores de membrana e é essencial para os mecanismos de reconhecimento celular (Carraway, 2000).

As diferentes atividades do citoesqueleto dependem de três tipos de filamentos protéicos: microfilamentos (formados por actina), microtúbulos (formados por tubulina) e filamentos intermediários (composição protéica varia de acordo com o tecido) (Figura 1). Cada tipo é formado pela polimerização dos monômeros protéicos específicos (Carraway, 2000; Alberts *et al.*, 2002). Os três tipos de filamentos do citoesqueleto são conectados entre

si e suas funções são coordenadas, permitindo a participação em inúmeras atividades celulares em conjunto com diversas proteínas acessórias (Alberts *et al.*, 2002; Bear *et al.*, 2002).



**Figura 1:** Representação esquemática dos constituintes do citoesqueleto. Adaptado de Alberts *et al.*, 2002 e [www.mie.utoronto.ca/labs/lcdlab/biopic](http://www.mie.utoronto.ca/labs/lcdlab/biopic), acessado em 07.11.2006.

### 1.1.1. Filamentos Intermediários

Os filamentos intermediários (FI) são filamentos longos com um diâmetro em torno de 10 nm, tamanho intermediário entre os filamentos de actina (7 nm) e os microtúbulos (25 nm). São polímeros de subunidades fibrosas (Alberts *et al.*, 2002) codificadas por uma das maiores famílias de genes no genoma humano (Hesse *et al.*, 2001). Apresentam um domínio central em  $\alpha$ -hélice altamente conservado e regiões amino- e carboxi-terminal variáveis (Figura 2), com diferenças que permitem a classificação dos FI em seis subtipos diferentes: subtipo I – queratinas ácidas; subtipo II – queratinas básicas e neutras; subtipo III – desmina, vimentina, periferina e proteína glial fibrilar ácida (GFAP); subtipo IV – neurofilamentos; subtipo V – lamina nucleares e subtipo VI – nestina (Fuchs & Weber, 1994; Elder *et al.*, 1999; Herrmann & Aebi, 2000; Inada *et al.*, 2000; Lanviere & Julien, 2004).

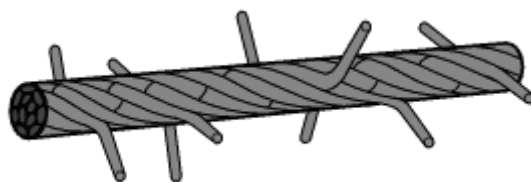


**Figura 2:** Representação esquemática da estrutura da subunidade de um FI. Adaptado de Cooper *et al.*, 2001.

As principais funções dos FI são a manutenção da forma celular, integridade estrutural e organização do citoplasma, bem como, interação com organelas e outros componentes do citoesqueleto. Além disso, os FI também apresentam uma função ativa na proteção contra o estresse mecânico e não mecânico (Chou *et al.*, 1997; Omary & Ku, 1997; Fuchs & Cleveland, 1998;) e na transdução de sinal à partir da membrana plasmática para o núcleo (Paramio & Jorcano, 2002; Chang & Goldman, 2004).

#### 1.1.1.1. Neurofilamentos

Os neurofilamentos constituem o principal tipo de FI encontrado em neurônios adultos (Lee & Cleveland, 1996). São formados pela polimerização de três subunidades: os neurofilamentos de baixo (NF-L; 68 kDa), médio (NF-M; 150 kDa) e alto peso molecular (NF-H; 200 kDa) (Alberts *et al.*, 2002). A extremidade amino-terminal juntamente com a região em  $\alpha$ -hélice da subunidade de baixo peso molecular, NF-L, interagem lateralmente e longitudinalmente formando a estrutura propriamente dita do neurofilamento, (Geisler & Weber, 1981), enquanto que as regiões carboxi-terminais das subunidades de médio (NF-M) e alto peso molecular (NF-H) são responsáveis pelas projeções laterais, que permitem a interação dos neurofilamentos entre si e com os demais constituintes do citoesqueleto (Hisanga & Hirokawa, 1988; Gotow *et al.*, 1992; Kirkpatrick & Brady, 1999) (Figura 3).



**Figura 3:** Representação esquemática de um neurofilamento, onde a região central é formada pelas três subunidades (NF-L, NF-M e NF-H) e as projeções laterais são constituídas pelas regiões carboxi-terminais das subunidades NF-M e NF-H. Adaptado de Kirkpatrick & Brady, 1999.

Os neurofilamentos são importantes na estrutura do axônio e a sua densidade determina e mantém o calibre axonal (Hoffman *et al.*, 1987; Xu *et al.*, 1996; Elder *et al.*, 1998, Fuchs & Cleveland, 1998; Kriz *et al.*, 2000). Eles são sintetizados dentro do corpo celular e posteriormente transportados para o axônio, sendo a fosforilação do domínio carboxi-terminal da NF-H um importante mecanismo regulatório do transporte axonal (Jung *et al.*, 2000). Além disso, a fosforilação dos neurofilamentos pode alterar a interação deles entre si ou com outros componentes do citoesqueleto (Li *et al.*, 1999).

O acúmulo anormal e a desorganização dos neurofilamentos são característicos de algumas doenças como esclerose amiotrófica lateral, atrofia muscular infantil e neuropatia motor-sensorial hereditária (Lee & Cleveland, 1996; Fuchs & Cleveland, 1998; Al-Chalabi *et al.*, 1999; Brandt, 2001).

#### **1.1.1.2. Proteína Glial Fibrilar Ácida (GFAP)**

A GFAP é uma proteína de 50 kDa presente predominantemente em astrócitos maduros e, como outros filamentos intermediários, tem sua polimerização regulada por fosforilação (Inagaki *et al.*, 1994a; Karl *et al.*, 2000). Essa proteína é considerada um marcador de astrócitos e é importante na manutenção da forma dos mesmos e na modulação da motilidade celular. No SNC de vertebrados superiores, depois de uma injúria, os astrócitos tornam-se

reativos e respondem de uma maneira típica, processo esse chamado de astrogliose. A astrogliose é caracterizada pela rápida síntese de GFAP (Pekny *et al.*, 1999; Eng *et al.*, 2000).

A GFAP é importante para a interação astrócito-neurônio (McCall *et al.*, 1996; Eliasson *et al.*, 1999), participando do sofisticado sistema de comunicação intercelular recíproca que pode regular a liberação de neurotransmissores, a excitabilidade neuronal e a transmissão sináptica (Carmignoto, 2000).

### **1.1.1.3. Vimentina**

Entre as proteínas dos filamentos intermediários, a vimentina é a mais amplamente distribuída, ocorrendo em muitas células de origem mesenquimal. Além disso, é expressa de forma transitória durante o desenvolvimento em muitos tecidos (Alberts *et al.*, 2002). No SNC, é expressa na glia radial, astrócitos imaturos e também na glia de Bergmann no cerebelo. Durante a diferenciação dos astrócitos é substituída progressivamente por GFAP (Menet *et al.*, 2001).

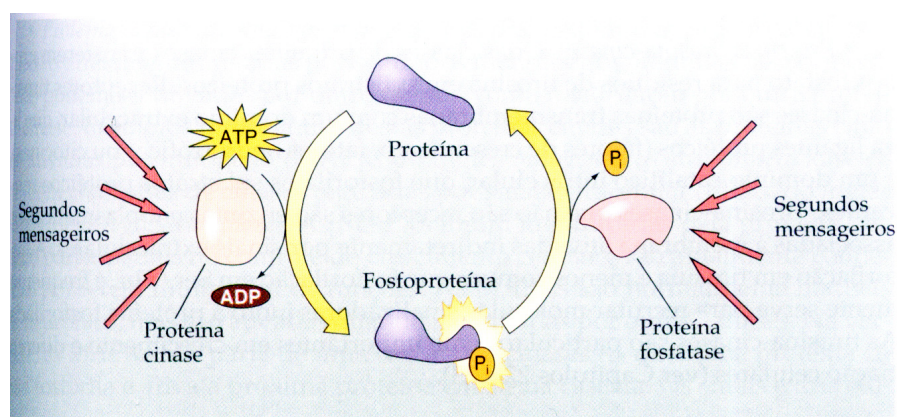
A vimentina, juntamente com a GFAP, participa do processo de gliose reativa após injúria no SNC (Pekny *et al.*, 1999; Menet *et al.*, 2001).

## **1.2. FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

A fosforilação de proteínas é um processo molecular reversível que desempenha um papel fundamental na regulação de diversas funções celulares, sendo o principal mecanismo utilizado no processo de transdução de sinal (Hunter, 1995).



Essa modificação covalente regula a função das proteínas em resposta a estímulos extracelulares (Nestler & Greengard, 1999). Segundos mensageiros típicos, como AMPc e cálcio, regulam funções neuronais através de alteração no estado de fosforilação de proteínas intracelulares. A fosforilação altera a função da proteína de uma maneira rápida e reversível. Proteínas são fosforiladas por uma ampla variedade de proteínas quinases e os grupamentos fosfato são removidos do substrato pelas proteínas fosfatases (Figura 4). O grau de fosforilação de uma proteína alvo reflete, portanto, um balanço entre as ações contrárias de proteínas quinases e fosfatases, integrando um conjunto de rotas de sinalização celular. Entre os substratos de quinases e fosfatases estão enzimas, receptores de neurotransmissores, canais iônicos e proteínas estruturais (Purves *et al.*, 2005).



**Figura 4:** Regulação de proteínas celulares por fosforilação. Proteínas quinases transferem grupos fosfato do ATP para resíduos de serina, treonina ou tirosina em substratos protéicos. A remoção dos grupos fosfato é catalisada por proteínas fosfatases. Adaptado de Purves *et al.*, 2005.

No SNC a fosforilação de proteínas está envolvida com a plasticidade de células neuronais (Schulman, 1995; Bhat, 1995), em eventos de aprendizagem e memória (Izquierdo & Medina, 1997; Viola *et al.*, 2000), na transdução de sinal e contribui para a eficácia da transmissão sináptica. Além disso, participa da regulação de uma variedade de processos, como atividade de enzimas, liberação de neurotransmissores e modulação de receptores e canais iônicos (Wallas & Greengard, 1991; Nairn & Shenolikar, 1992; Inagaki *et al.*, 1994b;

Jovanovic *et al.*, 2001; Koles *et al.*, 2001). A expressão de genes específicos em neurônios alvo é regulada através da fosforilação de fatores de transcrição e de proteínas ribossomais (Nestler & Greengard, 1999).

Os componentes do citoesqueleto estão entre as principais proteínas alvo modificadas em resposta à maioria dos sinais extracelulares que determinam a morfologia neuronal (Sánchez *et al.*, 2000). A fosforilação de proteínas do citoesqueleto e de suas proteínas associadas regula a forma e o funcionamento de astrócitos, a forma e a sobrevivência neuronal, assim como o transporte axonal e o crescimento e retração de dendritos e axônios (Nestler & Greengard, 1999).

### **1.2.1. Fosforilação dos filamentos intermediários**

A fosforilação dos FI parece ser um dos mecanismos predominantes na regulação da organização intracelular (Inagaki *et al.*, 1996a) e está relacionada com a sua capacidade de polimerização e interação com outras proteínas do citoesqueleto (Kirkpatrick & Brady, 1999; Inada *et al.*, 2000). Os sítios de fosforilação dos FI estão localizados nos domínios amino e carboxi-terminal. A fosforilação do domínio amino-terminal está relacionada com a capacidade de polimerização/despolimerização dos FI (Inagaki *et al.*, 1987), enquanto que a fosforilação do domínio carboxi-terminal tem implicações na interação com outras estruturas do citoesqueleto (Chou *et al.*, 1996).

A dinâmica de fosforilação/desfosforilação dos FI é variável e depende da natureza do FI, do tipo celular e do contexto biológico (Steinert *et al.*, 1982; Omary *et al.*, 1998; Omary *et al.*, 2006). É descrito que a fosforilação dessas proteínas aumenta várias vezes em determinadas situações fisiológicas, como na mitose ou no envelhecimento, ou em situações patológicas, como infecção ou exposição a toxinas (Gou *et al.*, 1995; Ku *et al.*, 1996).

O estado de fosforilação dos neurofilamentos tem papel importante no controle da integridade do citoesqueleto, no transporte e no diâmetro axonal (Strack *et al.*, 1997),

promove a interação desses FI com as mitocôndrias (Wagner *et al.*, 2003), pode modular a função de organelas (Toivola *et al.*, 2005) e protege os neurofilamentos da proteólise (Grant & Pant, 2000). Os neurofilamentos são altamente fosforilados *in vivo*, porém o grau de fosforilação do NF-M e do NF-H, e especialmente do NF-L, é diferente em cada compartimento neuronal, sendo altamente fosforilados no axônio, mas pouco fosforilado no corpo celular e nos dendritos (Gotow *et al.*, 1994; Gotow & Tanaka, 1994).

A fosforilação no domínio carboxi-terminal das subunidades NF-M e NF-H é responsável por aumentar o espaço entre os filamentos, regulando o calibre axonal (Nixon *et al.*, 1994; Bett *et al.*, 1997; Aranda-Espinoza *et al.*, 2002). Além disso, também está envolvida na regulação da velocidade de transporte axonal (Jung *et al.*, 2000; Ackerley *et al.*, 2003).

Assim como nos neurofilamentos, a polimerização da GFAP e da vimentina também é regulada pela fosforilação/desfosforilação do domínio amino-terminal, que contém muitos sítios fosforiláveis (Inagaki *et al.*, 1994a; Gohara *et al.*, 2001; Takemura *et al.*, 2002). A fosforilação da vimentina parece ter um papel importante na migração celular (Ivaska *et al.*, 2005), no entanto, sugere-se que a fosforilação da GFAP regula a plasticidade estrutural dos filamentos gliais e eventualmente as funções dos astrócitos (Takemura *et al.*, 2002).

### **1.3. COMPOSTOS ORGANOCALCOGÊNIOS**

Organocalcogênios são compostos orgânicos dos elementos oxigênio (O), enxofre (S), selênio (Se), telúrio (Te) e polônio (Po), localizados no grupo 16 da tabela periódica. São importantes intermediários e reagentes muito utilizados na síntese orgânica (Paulmier, 1986; Braga *et al.*, 1996, 1997).

Em sistemas biológicos, alguns compostos organocalcogênios são capazes de inibir enzimas que dependem dos grupos sulfidril para exercerem sua atividade catalítica, como a

5'lipoxigenase (Björnstedt *et al.*, 1996) e a escaleno monooxigenase (Gupta & Porter, 2001; Laden & Porter, 2001). Isso provavelmente ocorre pois esses compostos interagem com os resíduos cisteinil das proteínas (Laden & Porter, 2001).

### **1.3.1. Selênio**

O selênio, um elemento traço, é essencial para o crescimento e o desenvolvimento normal do organismo, sendo que a sua necessidade nutricional é reconhecida a muitos anos (Schwartz & Foltz, 1957). Esse elemento é um componente estrutural de várias enzimas com propriedades antioxidantes, entre elas, a glutathiona peroxidase (Flohé *et al.*, 1973; Rotruck, 1973).

#### **1.3.1.1. Disseleneto de Difenila**

O disseleneto de difenila [(PheSe)<sub>2</sub>] é um composto orgânico do selênio e apresenta atividades neuroprotetora (Ghisleni *et al.*, 2003), antinociceptiva, antiinflamatórias (Nogueira *et al.*, 2003a) e neuroquímica (Moretto *et al.*, 2003). Além disso, compostos de selênio são capazes de prevenir o efeito *in vitro* do metilmercúrio sobre a fosforilação das proteínas do citoesqueleto (Moretto *et al.*, 2005a).

No entanto, compostos orgânicos de selênio são também conhecidos por apresentarem toxicidade *in vitro* e *in vivo*. Eles podem ser neurotóxicos para roedores adultos (Nogueira *et al.*, 2003b), bem como nocivos para proteínas e enzimas de vários tecidos de mamíferos (Barbosa *et al.*, 1998; Maciel *et al.*, 2000; Farina *et al.*, 2001; Nogueira *et al.*, 2003c).

### **1.3.2. Telúrio**

O telúrio é um elemento relativamente raro e pertence ao grupo dos calcogênios, assim como o enxôfre e o selênio, mas ao contrário do selênio não apresenta nenhuma função fisiológica descrita até o momento (Taylor, 1996). Compostos de telúrio são usados ou

produzidos em vários processos industriais, por exemplo na produção de aço e no refino eletrolítico de metais pesados. Atualmente o telúrio é empregado também na manufatura de semicondutores, na indústria de componentes eletrônicos, síntese de fármacos e explosivos, na vulcanização de borracha, em lubrificantes sólidos, na petroquímica, entre outros (Clayton & Clayton, 1981; Taylor, 1996).

O aumento do uso industrial desse composto químico provoca riscos ocupacionais e ambientais para a saúde humana, porém as transformações bioquímicas e o significado biológico da exposição a essa substância são pouco compreendidos (Meotti *et al.*, 2003).

Tanto as formas orgânicas quando as inorgânicas do telúrio são altamente tóxicas para o SNC de roedores (Hu & Tappel, 1987; Maciel *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2001; Widy-Tyszewicz *et al.*, 2002), além disso, é descrito que a forma metálica desse composto pode causar lipofuccinose cerebral em ratos adultos (Duckett & White, 1974).

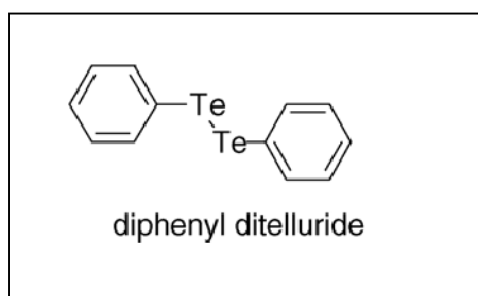
#### **1.3.2.1. Ditelureto de difenila**

O ditelureto de difenila [(PheTe)<sub>2</sub>] é um composto orgânico do telúrio, cuja fórmula está representada na Figura 5. Dados sobre a possível toxicidade de compostos orgânicos de telúrio são controversos. Há estudos, entretanto, mostrando que essas substâncias podem modificar a funcionalidade do sistema glutamatérgico *in vivo* e *in vitro* (Nogueira *et al.*, 2001) e são capazes de inibir a enzima escaleno monooxigenase, alterando a biossíntese do colesterol e provocando desmielinização do sistema nervoso periférico (Wagner-Recio *et al.*, 1991; Laden & Porter, 2001).

Segundo, Maciel *et al.*, 2000, o tratamento de camundongos com (PheTe)<sub>2</sub> revelou alterações histológicas acentuadas no cérebro. Além disso, uma única injeção subcutânea desse composto em ratas grávidas foi teratogênica para os fetos e tóxica para as mães (Stangherlin *et al.*, 2005). Em relação ao sistema fosforilante associado ao citoesqueleto, esse organocalcogênio induz um aumento da atividade *in vitro* de quinases que levam à

hiperfosforilação de proteínas do citoesqueleto em fatias de córtex cerebral de ratos (Moretto *et al.*, 2005b; Funchal *et al.*, 2006).

O átomo de telúrio presente em compostos orgânicos é facilmente oxidado, o que torna estes compostos aptos a inibirem a peroxidação estimulada em hepatócitos e microsomas de rins de ratos (Cotgreave *et al.*, 1991, Andersson *et al.*, 1994) e a retardarem a peroxidação do ácido linoleico a metanol (Engman *et al.*, 1995). Compostos orgânicos de telúrio apresentam potencial como substância antioxidante, portanto, provavelmente, são capazes de proteger proteínas e lipídios contra o estresse oxidativo em vários sistemas (Kanski *et al.*, 2001).



**Figura 5:** Estrutura do (PheTe)<sub>2</sub>. Adaptado de Borges *et al.*, 2005.

Estudos *in vitro* com (PheTe)<sub>2</sub> mostraram que ele é capaz de afetar a atividade de enzimas importantes para o funcionamento do SNC, como a Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase cerebral, que é inibida por esse composto de maneira dependente da concentração (Borges *et al.*, 2005). Esse resultado pode sugerir que a alteração da atividade dessa enzima possa estar relacionada com os danos ao SNC causados pelo (PheTe)<sub>2</sub>.

#### 1.4. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase

A bomba de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> é uma proteína integral de membrana, a qual é essencial para o funcionamento normal de todas as células de mamíferos. Ela é responsável pelo transporte ativo dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana plasmática, utilizando energia proveniente da hidrólise do ATP (Kaplan, 2002).

Um grande número de funções estão relacionadas com a manutenção do gradiente de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, tais como controle do volume celular, excitabilidade neuronal, atividade de enzimas citosólicas, contração muscular, além de auxiliar no movimento de outros íons através da membrana (Vasilets e Shwarz, 1993; Bertorello & Kartz, 1995; Alberts *et al.*, 2002). Essa enzima também está envolvida na diferenciação e sobrevivência celular (Yu, 2003)

A Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase está presente em grandes quantidades nos neurônios (Boldyrev, 1985) e em células gliais (Kwon *et al.*, 2003).

## 2. OBJETIVO

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar os efeitos do tratamento *in vivo* com (PheTe)<sub>2</sub> sobre o citoesqueleto e sobre a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito do tratamento *in vivo* com diferentes concentrações de (PheTe)<sub>2</sub> sobre o ganho de massa corporal em ratos jovens durante 6 dias consecutivos.
- Estudar o efeito do tratamento *in vivo* com (PheTe)<sub>2</sub> sobre a fosforilação de proteínas de filamentos intermediários (NF-H, NF-M, NF-L, vimentina e GFAP) em fatias de córtex cerebral e hipocampo de ratos 1, 3 ou 6 dias após a administração da droga.
- Determinar o efeito do tratamento *in vivo* com (PheTe)<sub>2</sub> sobre o imunoconteúdo dos neurofilamentos e da GFAP na fração citoesquelética e no homogenizado total de córtex cerebral de ratos em diferentes tempos após a exposição à droga.
- Avaliar o imunoconteúdo de GFAP em hipocampo de ratos 6 dias após a administração do (PheTe)<sub>2</sub>.
- Investigar a capacidade do (PheSe)<sub>2</sub> em prevenir o possível efeito desencadeado pelo (PheTe)<sub>2</sub> sobre a fosforilação dos filamentos intermediários.
- Caracterizar o efeito do tratamento *in vivo* com (PheTe)<sub>2</sub> sobre a atividade da Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase 3 e 6 dias após a exposição à droga.



## **PARTE II**

## 1. ARTIGO

Artigo submetido ao periódico Toxicology Letters.

Título: Effects of in vivo treatment with diphenyl ditelluride on the phosphorylation of cytoskeletal proteins and Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> ATPase activity in cerebral cortex and hippocampus of rats.

Autores: Luana Heimfarth, Samanta Oliveira Loureiro, Ariane Zamoner, Priscila de Lima Pelaez, Cristiane Matté, Cristina W. Nogueira, Angela T.S. Wyse, João Batista T. da Rocha, Regina Pessoa Pureur

Elsevier Editorial System(tm) for Toxicology Letters

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: EFFECTS OF IN VIVO TREATMENT WITH DIPHENYL DITELLURIDE ON THE PHOSPHORYLATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS AND NA+K+-ATPase ACTIVITY IN CEREBRAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS OF RATS

Article Type: Research Paper

Keywords: Organotellurium; intermediate filaments; protein phosphorylation; Na+-K+-ATPase; neuroprotection; diphenyl ditelluride.

Corresponding Author: Dr Regina Pessoa-Pureur, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Luana Heimfarth

Order of Authors: Luana Heimfarth; Samanta O Loureiro, PhD student; Ariane Zamoner; Priscila de Lima Pelaez; Cristiane Matté; Cristina W Nogueira; Angela Terezinha S Wyse, PhD; João Batista T Rocha, PhD; Regina Pessoa-Pureur, PhD

Abstract: In this work we investigated the effect of a single subcutaneous injection of diphenyl ditelluride (PheTe)<sub>2</sub> in 15 day-old Wistar rats (0.3 µmol/kg body weight) on the phosphorylation of intermediate filament (IF) proteins in cerebral cortex and hippocampus, 1, 3 or 6 days after injection. Results showed that at days 3 and 6 animals injected with (PheTe)<sub>2</sub> presented loss of body mass and hyperphosphorylation of neurofilaments, the neuronal IF, and astrocyte IFs, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (Vim) in cerebral cortex. Otherwise, in hippocampus, only GFAP and Vim were hyperphosphorylated at day 6 after injection. In cerebral cortex, this effect was accompanied by increased immunocontent of these proteins in tissue homogenate and associated with the cytoskeletal fraction. While in hippocampus only the GFAP immunocontent was increased, the hyperphosphorylation of cortical IF proteins, induced by (PheTe)<sub>2</sub>, was totally reversed by a single subcutaneous injection of diphenyl diselenide (PheSe)<sub>2</sub> (5µmol/kg body weight) 24 h after (PheTe)<sub>2</sub> administration. We also showed that beyond the effects of the in vivo treatment with (PheTe)<sub>2</sub> on the cytoskeleton of cortical cells, this neurotoxin inhibited Na+-K+-ATPase activity at day 6 after drug injection. Taken together, our results suggest that the cytoskeleton is more susceptible in cortical than in hippocampal cells. Moreover, cytoskeletal dysfunction and Na+-K+-ATPase inhibition in cortical cells could be involved in the neurotoxicity induced by acute treatment with (PheTe)<sub>2</sub>.

**EFFECTS OF *IN VIVO* TREATMENT WITH DIPHENYL DITELLURIDE ON THE  
PHOSPHORYLATION OF CYTOSKELETAL PROTEINS AND  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase  
ACTIVITY IN CEREBRAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS OF RATS**

Luana Heimfarth\*, Samanta Oliveira Loureiro\*, Ariane Zamoner\*, Priscila de Lima Pelaez\*,  
Cristiane Matté\*, Cristina Wayne Nogueira\*\*, Angela Terezinha de Souza Wyse\*, João  
Batista Teixeira Rocha\*\* and Regina Pessoa-Pureur\*

\*Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal  
do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil \*\* Departamento de Química, Centro de  
Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

**CORRESPONDENCE ADDRESS:** Dr. Regina Pessoa-Pureur, Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Bioquímica, Rua  
Ramiro Barcelos 2600 anexo, 90035-003 Porto Alegre RS BRASIL, Fax: 5551 3316 5535  
Tel: 5551 3316 5565 E-mail: [rpureur@ufrgs.br](mailto:rpureur@ufrgs.br)

## ABSTRACT

In this work we investigated the effect of a single subcutaneous injection of diphenyl ditelluride (PheTe)<sub>2</sub> in 15 day-old Wistar rats (0.3 μmol/kg body weight) on the phosphorylation of intermediate filament (IF) proteins in cerebral cortex and hippocampus, 1, 3 or 6 days after injection. Results showed that at days 3 and 6 animals injected with (PheTe)<sub>2</sub> presented loss of body mass and hyperphosphorylation of neurofilaments, the neuronal IF, and astrocyte IFs, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and vimentin (Vim) in cerebral cortex. Otherwise, in hippocampus, only GFAP and Vim were hyperphosphorylated at day 6 after injection. In cerebral cortex, this effect was accompanied by increased immunocontent of these proteins in tissue homogenate and associated with the cytoskeletal fraction, while in hippocampus only the GFAP immunocontent was increased. The hyperphosphorylation of cortical IF proteins, induced by (PheTe)<sub>2</sub>, was totally reversed by a single subcutaneous injection of diphenyl diselenide (PheSe)<sub>2</sub> (5 μmol/kg body weight) 24 h after (PheTe)<sub>2</sub> administration. We also showed that beyond the effects of the *in vivo* treatment with (PheTe)<sub>2</sub> on the cytoskeleton of cortical cells, this neurotoxin inhibited Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity at day 6 after drug injection. Taken together, our results suggest that the cytoskeleton is more susceptible in cortical than in hippocampal cells. Moreover, cytoskeletal dysfunction and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase inhibition in cortical cells could be involved in the neurotoxicity induced by acute treatment with (PheTe)<sub>2</sub>.

**KEYWORDS:** Organotellurium, intermediate filaments, protein phosphorylation, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, neuroprotection, diphenyl ditelluride

## INTRODUCTION

Intermediate filaments (IFs) are major components of the cytoskeleton and nuclear envelope in most types of eukaryotic cells. They are expressed in cell-type-specific patterns and play an important structural or tension-bearing role in the cell. Evidence is now emerging that IFs also acts as an important framework for the modulation and control of essential cell processes, in particular, signal transduction events (Paramio et al, 2002). The neuronal cytoskeleton comprises a protein network formed mainly by microtubules (MT) and neurofilaments (NF), the IFs of neurons. Neurofilaments are composed of three different polypeptides whose approximate molecular masses are 200, 160, and 68 kDa, and are commonly referred to as heavy (NF-H), medium (NF-M) and light (NF-L) neurofilament subunits (Ackerley et al, 2000). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) is the IF of mature astrocytes (Eng et al, 2000) and vimentin (Vim) is the IF of cells of mesenchimal origin (Alberts et al, 2002).

The phosphorylation of cytoskeletal components, such as IF proteins, may affect their assembly and organization ability (Martin et al., 1999) and several reports describe an altered activity of the phosphorylating system associated with cytoskeletal proteins in various neuropathological conditions and following the exposure to several neurotoxicants (Lapadula et al, 1986; Branco et al, 2000; Funchal et al, 2002; Moretto et al, 2005a).

The amino and the carboxy-terminal tail domains of NF subunits are potential phosphorylation sites (Sihag and Nixon, 1990; Nixon and Sihag, 1991). The functional role of neurofilament phosphorylation is to date not completely clear. However, phosphorylation of N-terminal domain of NF-L and other IF subunits has been related to their association into filamentous structures (Inagaki et al, 1987; Inagaki et al, 1990; Peter et al, 1992; Tanaka et al, 1993; Ku and Omary, 1997; Hashimoto et al, 1998; Inada et al, 1998). On the other hand, the carboxy terminal side arm domains of NF-H and NF-M subunits are extensively

phosphorylated by several protein kinases (Hisanaga et al, 1993; Shetty et al, 1993; Guidato et al, 1996; Sun et al, 1996). It has been demonstrated that *in vitro* phosphorylation of COOH-terminal domains of NF-H and NF-M straightens individual neurofilaments and promotes their alignment into bundles (Leterrier et al, 1996), whereas *in vivo* phosphorylation of these proteins is associated with an increased interneurofilament spacing (Hsieh et al, 1994). As a consequence, NF-H and NF-M COOH-terminal side arms extend and form crossbridges among neurofilaments and other cytoskeletal elements (Gotow et al, 1994).

Organochalcogen compounds have been described to possess very interesting biological activities. Several reports have been published on glutathione peroxidase (GSH-Px)-mimetic activity of chalcogen compounds, which, like the native enzyme, rely on the redox cycling of selenium or tellurium moiety of the compounds (Nogueira et al, 2004). In this context, we have recently demonstrated that diphenyl diselenide (PheSe)<sub>2</sub>, a simple organochalcogenide, has neuroprotective and anti-inflammatory activity (Ghisleni et al, 2003; Nogueira et al, 2004). Contrasting with this selenium containing compound, diphenyl ditelluride (PheTe)<sub>2</sub>, an analogous molecule of (PheSe)<sub>2</sub>, was extremely toxic to rodents and caused marked neurotoxic effects in mice after acute or prolonged exposure (Stangherlin et al, 2005). Furthermore, (PheTe)<sub>2</sub> is highly toxic to rats and changes brain neurochemical parameters after *in vitro* and *in vivo* exposure (Moretto et al, 2003).

Recently, we have reported the effect of (PheTe)<sub>2</sub> on the *in vitro* phosphorylation of IF proteins in slices of cerebral cortex of rats and prevention of this effect by selenium compounds (Moretto et al, 2005a; 2005b). However, little is known about the *in vivo* effect of (PheTe)<sub>2</sub>, on cytoskeletal proteins, specially on IF phosphorylation.

Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase (EC 3.6.1.37) also known as Na<sup>+</sup> pump, is embedded in the cell membrane and is responsible for the active transport of sodium and potassium ions in the nervous system. This process regulates the cellular Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> concentrations and hence their gradients across the plasma membrane, which are required for vital functions such as

membrane co-transporters, cell volume regulation and membrane excitability (Jorgensen, 1986; Doucet, 1988). This dimeric enzyme exists in several isoforms in brain and consumes the greater part of available ATP (Bertorello and Kats, 1995). The inactivation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase leads to partial membrane depolarization allowing excessive Ca<sup>2+</sup> entry inside neurons with resultant toxic events like excitotoxicity (Beal et al, 1993). In this context, the activity of this enzyme is decreased in cerebral ischemia (Wyse et al, 2000) and in neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (Dickey et al, 2005).

Regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity is a complex process, including increased biosynthesis of new isoforms (Lopina et al, 2001), and phosphorylation of specific amino acid residues by different protein kinases (Bertorello et al, 1991; Fotis et al, 1999; Feraille et al, 1999; Yudowski et al, 2000). Also, interaction of the enzyme with cytoskeletal elements, such as acetylated tubulin (Casale et al, 2005) and stress fibers (Rajasekaran and Rajasekaran, 2003) has been reported to be associated with the modulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity. In addition, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase is a sulfhydryl-containing enzyme sensitive to oxidizing agents (Carfagna et al, 1996; Folmer et al, 2004).

Taking into account these findings, the aim of the present study is to investigate the effects of *in vivo* treatment with (PheTe)<sub>2</sub> on the phosphorylation of IF proteins of two important cerebral structures, cortex and hippocampus and the ability of (PheSe)<sub>2</sub> to prevent such effects. We also evaluated the effect of the injected (PheTe)<sub>2</sub> on the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex membranes in an attempt to corroborate our continuous efforts in investigating the mechanisms involved in the toxicity induced by organochalcogens.

## **MATERIALS AND METHODS**



**Radiochemical and compounds** - [ $^{32}\text{P}$ ]Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> was purchased from CNEN, São Paulo, Brazil. Benzamidine, leupeptin, antipain, pepstatin, chymostatin, bovine serum albumin, acrylamide, bis-acrylamide, antibodies, all reagents for electrophoresis and all chemicals for Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity assay were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). ECL kit was from Amersham, Oakville, Ontario. The organochalcogenides (PheSe)<sub>2</sub> and (PheTe)<sub>2</sub> were synthesized using the method described by Paulmier (1986) and Petragami (1994), respectively. All other chemicals were of analytical grade and were purchased from standard commercial supplier.

**Animals** - Fifteen day-old Wistar rats were obtained from our breeding stock. Rats were maintained on a 12-h light/12-h dark cycle in a constant temperature (22 °C) colony room. On the day of birth the litter size was culled to eight pups. Litters smaller than eight pups were not included in the experiments. Water and a 20% (w/w) protein commercial chow were provided ad libitum. The experimental protocol followed the “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH publication 85-23, revised 1985) and was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Rio Grande do Sul.

**Drug administration** - Fifteen day-old Wistar rats were treated with a single subcutaneous (s.c.) injection of (PheTe)<sub>2</sub> 0.01-0.5 μmol/kg body weight or canola oil (vehicle) (2,8 ml/kg body weight). Body weight measurements were obtained daily up to day 6 after (PheTe)<sub>2</sub> administration. In the experiments concerned to study cytoskeletal alterations, 15 day-old Wistar rats were exposed to a single subcutaneous injection of 0.3 μmol/kg body weight (PheTe)<sub>2</sub> or canola oil, 2.8 ml/kg body weight. All the results were obtained 1, 3 or 6 days after treatment. In the experiments designed to study prevention of (PheTe)<sub>2</sub> effects, animals were treated with a single subcutaneous injection of (PheSe)<sub>2</sub> (5 μmol/kg body weight) 24 h after the (PheTe)<sub>2</sub> administration. Rats were sacrificed 3 days after (PheSe)<sub>2</sub> injection.

**Preparation and labelling of slices** - Rats were killed 1, 3 or 6 days after (PheTe)<sub>2</sub> administration by decapitation, cerebral cortex and hippocampus were dissected onto Petri dishes placed on ice and cut into 400 µm thick slices with a McIlwain chopper.

**Preincubation** - Tissue slices were initially preincubated at 30 °C for 20 min in a Krebs-Hepes medium containing 124 mM NaCl, 4 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 25 mM Na-HEPES (pH 7.4), 12 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, and the following protease inhibitors: 1 mM benzamidine, 0.1 µM leupeptin, 0.7 µM antipain, 0.7 µM pepstatin and 0.7 µM chymostatin

**In vitro <sup>32</sup>P incorporation experiments** - After preincubation, the medium was changed and incubation was carried out at 30 °C with 100 µl of the basic medium containing 80 µCi of [<sup>32</sup>P] orthophosphate. The labeling reaction was normally allowed to proceed for 30 min at 30 °C and stopped with 1 ml of cold stop buffer (150 mM NaF, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, Tris-HCl 50 mM, pH 6.5), and the protease inhibitors described above. Slices were then washed twice with stop buffer to remove excess radioactivity.

**Preparation of the high salt-Triton insoluble cytoskeletal fraction from tissue slices** - After incubation, preparations of IF-enriched cytoskeletal fractions were obtained from hippocampus or cerebral cortex of rats as described by Funchal et al (2003). Briefly, after the labelling reaction, slices were homogenized in 400 µl of ice-cold high salt buffer containing 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (pH 7.1), 600 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 and the protease inhibitors described above. The homogenate was centrifuged at 15800 x g for 10 min at 4 °C, in an Eppendorf centrifuge, the supernatant discarded and the pellet homogenized with the same volume of the high salt medium. The resuspended homogenate was centrifuged as described and the supernatant was discarded. The Triton-insoluble IF-enriched pellet, containing NF subunits, Vim and GFAP, was dissolved in 1% SDS and protein concentration was determined.

**Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)** - The cytoskeletal fraction was prepared as described above. Equal protein concentrations were loaded onto 10% polyacrylamide gels and analyzed by SDS-PAGE according to the discontinuous system of Laemmli (1970). After drying, the gels were exposed to X-ray films (X-Omat XK1) at -70 °C with intensifying screens and finally the autoradiograph was obtained. Cytoskeletal proteins were quantified by scanning the films with a Hewlett-Packard Scanjet 6100C scanner and determining optical densities with an Optiquant version 02.00 software (Packard Instrument Company). Density values were obtained for the studied proteins.

**Preparation of total protein homogenate** - Tissues slices were homogenized in 100µl of a lysis solution containing 2mM EDTA, 50 mM Tris-HCL, pH 6.8, 4% (w/v) SDS. For electroforesis analysis, samples were dissolved in 25% (v/v) of solution containing 40% glycerol, 5% mercaptoethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 and boiled for 3 min.

**Immunoblotting analysis** - Cytoskeletal fractions (50 µg) or homogenate (80 µg) were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Trans-blot SD semi-dry transfer cell, BioRad) for 1 h at 15 V in transfer buffer (48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol and 0.25% SDS). The nitrocellulose membranes were washed for 10 min in Tris-buffered saline (TBS; 0.5 M NaCl, 20 mM Trizma, pH 7.5), followed by 2 h incubation in blocking solution (TBS plus 5% defatted dried milk). After incubation, the blot was washed twice for 5 min with TBS plus 0.05% Tween-20 (T-TBS), and then incubated overnight at 4 °C in blocking solution containing the following monoclonal antibodies: anti NF-150 (clone NN-18) diluted 1:500, anti NF-68 (clone NR-4) diluted 1:1000, anti NF-200 (clone NE14) diluted 1:1000, anti NF-200 (clone N52) diluted 1:1000 and anti GFAP (clone G-A-5) diluted 1:400. The blot was then washed twice for 5 min with T-TBS and incubated for 2 h in blocking solution containing peroxidase conjugated rabbit anti-mouse IgG diluted 1:4000. The blot was washed twice again for 5 min with T-TBS and twice for 5 min with TBS. The blot was then developed using a chemiluminescence ECL kit.

**Preparation of synaptic plasma membrane from cerebral cortex** - For preparation of synaptic plasma membrane and determination of  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity, rats were killed 3 or 6 days after the drug administration (as described above) by decapitation and the cerebral cortex was dissected and homogenized in 10 volumes of 0.32 M sucrose solution (1:10 w/v) containing 5.0 mM HEPES and 1.0 mM EDTA, pH 7.4. After, synaptic plasma membrane from cerebral cortex was prepared according to the method of Jones and Matus (1974) with some modifications (Wyse et al, 1998). The homogenate was centrifuged at 1000 x g for 10 min and the supernatant removed and centrifuged at 12,000 x g for 20 min. The pellet was then resuspended in hypotonic buffer (5.0 mM Tris-HCl buffer, pH 8.1) at 0 °C for 30 min, and applied on a discontinuous sucrose density gradient consisting of successive layers of 0.3, 0.8 and 1.0 M. After centrifugation at 69,000 x g for 120 min, the fraction between 0.8 and 1.0 M sucrose interface was taken as the membrane enzyme preparation.

**$\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity assay** - The reaction mixture for  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity assay contained 5.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 80.0 mM NaCl, 20.0 mM KCl and 40.0 mM Tris-HCl, pH 7.4, in a final volume of 200  $\mu\text{l}$ . The reaction was initiated by ATP addition. Controls were carried out under the same conditions with the addition of 1.0 mM ouabain.  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity was calculated by the difference between the two assays, as described by Wyse et al (1998). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan et al (1986). Specific enzyme activity was expressed as nmol Pi released / min / mg of protein. All samples were run in duplicate.

**Protein determination-** The protein concentration was determined by the method of Lowry et al (1951) or Bradford (1976) using serum bovine albumin as the standard.

**Statistical analysis-** Data were analyzed statistically by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the LSD post-hoc comparisons when the F-test was significant. All analyses were performed using the SPSS software program on an IBM-PC compatible computer.

## RESULTS

Initially we evaluated the effect of the acute administration of (PheTe)<sub>2</sub> at different doses (0.01, 0.1, 0.3 and 0.5 µmol/Kg body weight) on body weight. Figure 1 shows that a single administration of 0.3 or 0.5 µmol (PheTe)<sub>2</sub>/Kg body weight caused a dramatic reduction on body mass from day 2 after treatment onward. On the basis on these results we have chosen the concentration of 0.3 µmol/Kg body weight for further experiments.

When cortical slices from rats injected with (PheTe)<sub>2</sub> were incubated with <sup>32</sup>P-orthophosphate, we observed that the phosphorylation pattern of all cytoskeletal proteins studied (GFAP, Vim, NF-L and NF-M) was increased at days 3 and 6 after treatment (Figure 2A, B, C and D). Interestingly, the increased level of phosphorylated NF-H was immunodetected only after day 6 (Figure 3 A and B). Conversely, in the hippocampal slices from the same animals, the endogenous phosphorylating level of the cytoskeletal proteins was not altered, except for the astrocyte IF proteins, GFAP and Vim, whose phosphorylation level was increased at day 6 after (PheTe)<sub>2</sub> injection (Figure 2E, F, G and H).

We next analyzed the effect of (PheTe)<sub>2</sub> injection on the immunocontent of the IF proteins of total cell homogenate and recovered into the high-salt Triton-insoluble cytoskeletal fraction of cortical slices at day 3 after treatment. Results showed that the immunocontent of GFAP and NF-L were significantly increased in cell homogenates and into the cytoskeletal fraction. In addition, the immunocontent of NF-M, was significantly increased only into the cytoskeletal fraction (Figure 3 A). Nonetheless, at day 6 after (PheTe)<sub>2</sub> injection, the immunocontent of the astrocyte IF protein (GFAP) was increased and the effect was observed both in total cell homogenate and in the cytoskeletal fraction. Otherwise, the immunocontent of total NF-H was increased only in cell homogenate (Figure 3 B). We also analyzed the immunocontent of GFAP in hippocampal slices at day 6 after (PheTe)<sub>2</sub> treatment. Results showed an increased GFAP immunoreaction associated with the

cytoskeletal fraction, without altering the immunocontent of this protein in the total cell homogenate (Figure 4).

In order to test the protective action of (PheSe)<sub>2</sub> on the *in vivo* effects of (PheTe)<sub>2</sub> on the IF-associated phosphorylating system, the organoselenium compound was injected 24 h after the (PheTe)<sub>2</sub> administration. Results showed that (PheSe)<sub>2</sub> *per se* was not able to alter the *in vitro* phosphorylation of the proteins studied in cerebral cortex, however it prevented the effects induced by (PheTe)<sub>2</sub> (Figure 5).

Finally, we investigated the ability of (PheTe)<sub>2</sub> in altering the membrane-bound Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity. Results showed that the *in vivo* treatment with (PheTe)<sub>2</sub> significantly decreased the activity of this enzyme in synaptic membranes of cerebral cortex, and this effect was observed only at day 6 after the neurotoxin injection (Figure 6).

## DISCUSSION

Tellurium, a rare element, used as an industrial component of many alloys and in the electronic industry, can cause poisoning which leads to neurotoxic symptoms such as significant impairment of learning and spatial memory (Walbran and Robins, 1978; Widy-Tyszkiewicz et al, 2002 ) and reproductive toxicity (Stangherlin et al, 2006). Also, we have shown that (PheTe)<sub>2</sub> inhibited brain Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity *in vitro* (Borges et al, 2005). However the effects of this element on the cytoskeletal proteins are poorly known. Nonetheless, we have previously demonstrated that slices of cerebral cortex of young rats exposed to toxically relevant concentrations of (PheTe)<sub>2</sub> presented an increased *in vitro* phosphorylation of IF proteins associated to the cytoskeletal fraction. Moreover, this effect was prevented by the selenium compounds ebselen and (PheSe)<sub>2</sub> (Moretto et al, 2005b). However, at the present we have no evidence regarding the *in vivo* effects of this neurotoxin on either Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase or the cytoskeleton phosphorylation in different brain structures. In

addition, the ability of the selenium compounds in protecting the tissues against such effects is poorly known.

In the present study we initially established the toxic dose and the time-action characteristics of (PheTe)<sub>2</sub> acutely injected using body weight measurements as the end point of toxicity. We then observed a significant loss of body weight in acute exposure to (PheTe)<sub>2</sub> at 0.3 and 0.5 µmol/Kg of body weight from day 2 up to day 6 after drug exposure, probably indicating systemic toxicity at these concentrations. The loss of body mass has been previously related to the toxicity of (PheTe)<sub>2</sub> by Stangherlin et al (2006), who described that male adult rats acutely exposed to (PheTe)<sub>2</sub> presented significant loss of body weight at days 3 and 5 after injection. Taking into account our data and the evidences in the literature, we have chosen the injection of (PheTe)<sub>2</sub> at 0.3 µmol/Kg body weight as well as days 1, 3 and 6 after drug injection to undertake our experimental approach.

In this report we demonstrated that young rats acutely injected with (PheTe)<sub>2</sub> presented hyperphosphorylated IF proteins NF-H, NF-M, NF-L, Vim and GFAP in cerebral cortex at days 3 and 6 after treatment, reflecting an altered activity of the endogenous phosphorylating system associated to the IF proteins in this cerebral structure. Conversely, the phosphorylation of the cytoskeletal proteins in the hippocampus of the same animals was affected to a lesser extent, that is to say, only the astrocyte IFs, Vim and GFAP were hyperphosphorylated. In addition, this effect was observed latter after the neurotoxicant injection (day 6). These findings provide an interesting insight on the differential susceptibilities of cerebral cortex and hippocampus IF cytoskeleton to the acute injury induced by this neurotoxicant. Although we do not know the mechanisms underlying such effects, they are probably related to the differential physiological responses of cortical and hippocampal neurons and astrocytes to the insult.

In cerebral cortex, the IF hyperphosphorylation was accompanied by an increased immunocontent of GFAP and NF-L both in tissue homogenate and in the high-salt Triton

insoluble cytoskeletal fraction at day 3 after the injection. We could tentatively explain these results suggesting that, in cerebral cortex, the (PheTe)<sub>2</sub> somehow increased the expression or altered the turnover of these proteins leading to an accumulation of the hyperphosphorylated forms associated to the cytoskeleton, representing the *in vivo* polymerized or aggregated IF proteins (Funchal et al 2003). This effect was apparently more persistent in astrocytes than in neurons, as evidenced by the increased GFAP and unaltered NF immunoccontent at day 6 after drug injection, supporting a reactive gliosis following the neuronal damage induced by the NF hyperphosphorylation. In addition, the increased immunoreactivity of hyperphosphorylated NF-H, observed in the cytoskeletal fraction at day 6 after treatment, seems to be a transient effect related to changes in the stoichiometry of NF protein subunits, which have been described to other pathological conditions, such as the abnormal functioning of spinal motor neurons (Meier et al, 1999). In addition, hyperphosphorylation of NF-H could block axonal transport mechanically interfering with the transport machinery (Grant and Pant, 2000).

The high susceptibility of the IF-associated phosphorylating system to neurotoxins in cerebral cortex of rats has been previously demonstrated in *in vitro* studies using tissue slices exposed to methylmercury (Moretto et al, 2005a) and to metabolites accumulating in disorders of the branched-chain amino acid metabolism (Funchal et al, 2002; Funchal et al, 2005). In this context, it has been largely described that aberrant phosphorylation/dephosphorylation of cytoskeletal proteins may have serious consequences for cellular function and structure and these mechanisms are related to neuronal damage in various neurodegenerative diseases (Goedert et al, 1998; Julien and Mushynski, 1998; Julien, 1999).

Conversely, in hippocampus, GFAP hyperphosphorylation observed at day 6 after injection was not accompanied by an increased immunoccontent of this protein in total cell homogenate despite its increased immunoreactivity in the cytoskeletal fraction, suggesting an altered polymerization/depolymerization equilibrium of GFAP. This possibility is supported



by evidences that the dynamic properties of IF proteins are known to be regulated by phosphorylation, which in turn appears to lead to reorganization of IF networks (Inagaki et al, 1996). In this context, GFAP reorganization has been described in cultured astroglia in response to protein kinase A-dependent hyperphosphorylation, resulting in morphological changes (Pollenz et al, 1986).

Taking into account the cytoskeletal response to the (PheTe)<sub>2</sub> injury, our results show a lesser vulnerability of hippocampal neurons than astrocytes to the neurotoxin used, evidenced by the unaltered phosphorylation level of the neuronal IF proteins. This is further supported by the unchanged total immunoccontent of GFAP, which is not consistent with reactive gliosis (Briones et al, 2006). We could then suppose that the effect of (PheTe)<sub>2</sub> acute treatment on the IF-associated phosphorylating system precede a reorganization of the hyperphosphorylated IF proteins. This possibility is supported by evidences that the dynamic properties of IF proteins are known to be regulated by phosphorylation, which in turn appears to lead to reorganization of IF networks (Inagaki et al, 1996). In addition, pathological hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins is related to aggregates of cytoskeletal elements in different cell compartments, characteristic of neurodegenerative diseases (Petzold, 2005).

It is important to emphasize that the effect of (PheTe)<sub>2</sub> was not mimicked by its analogous selenium compoud (PheSe)<sub>2</sub>, since diselenide *per se*, was unable to cause alterations in the phosphorylation level of the IF proteins. Nonetheless (PheSe)<sub>2</sub> injection 24 h after (PheTe)<sub>2</sub> was able to prevent the effects induced by this organotellurium compound on IF phosphorylation. These findings are in line with our previous results showing that the organoselenium compounds ebselen and (PheSe)<sub>2</sub> prevented the stimulatory effects of the *in vitro* treatment with (PheTe)<sub>2</sub> on the phosphorylation of IF proteins in slices of cerebral cortex of young rats (Moretto et al, 2005b).

Although the mechanisms underlying the effects induced by (PheTe)<sub>2</sub>, in our experimental approach are not clear, we could speculate that this compound would be transformed in its reducing intermediate: phenyl tellurol (benzenetellurol) (Zeni et al, 2000; 2003; 2004), which is a potent nucleophile agent. This intermediate could attack the phosphorylating/dephosphorylating systems of the IF proteins activating them by a redox mechanism. The protective effect of ebselen and (PheSe)<sub>2</sub> against the stimulatory effect of (PheTe)<sub>2</sub> can be related to the weaker potency of its selenol intermediate as reducing agent, when compared to its tellurol analogue (Pearson et al, 1968; Haller and Irgolic, 1972). Furthermore, they could also compete with (PheTe)<sub>2</sub> for the cellular system that originates the nucleophilic form of these chalcogenides. However, further experiments will be necessary to clarify this point.

Our results also indicate that acute treatment with (PheTe)<sub>2</sub> inhibits Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in cerebral cortex. A similar effect was reported *in vitro* for total brain homogenate of adult rats and it was ascribed to the interaction of the organochalcogen with cysteinyl residues that are important for enzyme activity (Borges et al, 2005). The importance of thiol groups for Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase has been previously described. In fact, -SH groups of this enzyme are highly susceptible to oxidative stress (Yufu et al, 1993) and oxidizing agents (Carfagna et al, 1996). On the other hand, we can not exclude the possibility that cytoskeletal hyperphosphorylation could be implicated in the decreased Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity, since the modulation of sodium pump in living cells involves the association/dissociation with cytoskeletal proteins (Casale et al, 2003; Woroniecki et al, 2003; Rajasekaran and Rajasekaran, 2003; Casale et al, 2005). Moreover, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase can be modulated by phosphorylation mediated by several protein kinases (Bertorello et al, 1991; Feraille et al, 1999; Fotis et al, 1999; Yudowski et al, 2000) but the consequences of this phosphorylation for enzyme activity are still unknown (Lopina et al, 2001). We could, suppose that activation of protein kinases induced by (PheTe)<sub>2</sub> could phosphorylate Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase beyond cytoskeletal proteins, leading to enzyme inhibition.

In summary, our results showed that *in vivo* treatment with (PheTe)<sub>2</sub>, a neurotoxic organic tellurium compound markedly activated the phosphorylating system associated to the cytoskeleton, in cerebral cortex of rats suggesting that this structure is more sensible to the action of this neurotoxin than hippocampus. Furthermore, the neurotoxic action of this drug in the cerebral cortex included inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity. Since inhibition of this enzyme may lead to the increased intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration (Moore et al, 1993), we presume that misregulation of the cytoskeleton and the inhibition of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase would probably contribute to the deleterious action of this toxin on the brain, a fact that might explain at least in part the (PheTe)<sub>2</sub> neurotoxicity.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

## REFERENCES

- Ackerley, S., Grierson, A.J., Brownlees, J., Thornhiel, P., Anderton, B.H., Leight, P.N., Shew, C.E., Mielerc, C.J., 2000. Glutamate slow axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. *J. Cell Biol.* 150, 165-175.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., 2002 The cytoskeleton. In: Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (Eds.), *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science, pp. 907-982.
- Beal, M.F., Hyman, B.T., Koroshetz, W., 1993. Do effects in mitochondrial energy metabolism underlie the pathology of neurodegenerative diseases? *Trends Neurosci.* 16, 125-131.
- Bertorello, A.M., Aperia, A., Walaas, S.I., Nairn, A.C., Greengard, P., 1991. Phosphorylation of the catalytic subunit of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase inhibits the activity of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11359-11362.
- Bertorello, A.M., Katz, A.L., 1995. Regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-pump activity: pathways between receptors and effectors. *NIPS* 10, 253-259.
- Borges, V.C., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2005. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity in rats. *Toxicol.* 215, 191-197.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-die-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- Branco, T., Meirelles, R., da Rocha, B.B., de Mattos-Dutra, A., Wajner, M., Pessoa-Pureur-R., 2000. Alpha-ketoisocaproate increases the in vitro  $^{32}\text{P}$  incorporation into intermediate filaments in cerebral cortex of rats. *Neuroreport* 11, 3545-3550.
- Briones, T.L., Woods J., Wadowska, M., Rogozinska, M., Nguyen, M., 2006. Astrocytic changes in the hippocampus and functional recovery after cerebral ischemia are facilitated by rehabilitation training. *Behav. Brain Res.* 171, 17-25.
- Casale, C.H., Previtali, G., Barra, H.S., 2003. Involvement of acetylated tubulin in the regulation of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in cultured astrocytes. *FEBS Lett.* 534, 115-118.
- Casale, C.H., Previtali, G., Serafino, J.J., Arce, C.A., Barra, H.S., 2005. Regulation of acetylated tubulin/ $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase interaction by L-glutamate in non-neural cells: involvement of microtubules. *Biochim. Biophys. Acta* 1721, 185-192.
- Carfagna, M.A., Ponsler, G.D., Muhoberac, B.B., 1996. Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membrane by simultaneous exposure to metals. *Chem. Biol. Interact.* 100, 53-65.
- Chan, K.M., Delfer, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for  $\text{Ca}^{2+}$  - stimulated ATPase activity. *Anal. Biochem.* 157, 375-380.
- Dickey, C.A., Gordon, M.N., Wilcock, D.M., Herber, D.L., Freeman, M.J., Morgan, D., 2005. Dysregulation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase by amyloid in APP+PS1 transgenic mice. *BMC Neurosci.* 6, 7.
- Doucet, A., 1988. Function and control of  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase in single nephron segments of the mammalian kidney. *Kidney Int.* 34, 749-760.

- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., Lee, Y.L., 2000. Glial Fibrillary Acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* 25, 1439-1451.
- Feraille, E., Carranza, M.L., Gonin, S., Beguin, P., Pedemonte, C., Rousselot, M.m Caverzasio, J., Geering, K., Martin, P.V., Favre, H., 1999. Insulin-induced stimulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the alpha-subunit at Tyr-10. *Mol. Biol. Cell* 10, 2847- 2859.
- Folmer, V., Santos, F.W., Savegnago, L., Brito, V.B., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2004. High sucrose consumption potentiates the sub-acute cadmium effect on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase but not on the  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase in mice. *Toxicol. Lett.* 153, 333-341.
- Fotis, H., Tatjanenko, L.V., Vasilets, L.A., 1999. Phosphorylation of the alpha-subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from mammalian kidneys and *Xenopus* oocytes by cGMP-dependent protein kinase results in stimulation of ATPase activity. *Eur. J. Biochem.* 260, 904-910.
- Funchal, C., de Lima Pelaez, P., Oliveira Loureiro, S., Vivian, L., Dall Bello Pessutto, F., de Almeida, L.M.V., Tchernin-Wofchuk, S., Wajner, M., Pessoa-Pureur, R., 2002.  $\alpha$ -Ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments in postnatal rat cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. *Dev. Brain Res.* 139, 267-276.
- Funchal, C., de Almeida, L.M., Oliveira Loureiro, S., Vivian, L., de Lima Pelaez, P., Dall Bello Pessutto, F., Rosa, A.M., Wajner, M., Pessoa-Pureur, R., 2003. In vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of rats. *Brain Res. Prot.* 11, 111-118.
- Funchal, C., Quincozes dos Santos, A., Jacques-Silva, M.C., Zamoner, A., Gottfried, C., Wajner, M., Pessoa-Pureur, R., 2005. Branched-chain  $\alpha$ -keto acids accumulating in maple

- syrup urine disease induce reorganization of phosphorylated GFAP in c6 glioma cells. *Metab. Brain Dis.* 20, 205-219.
- Ghisleni, G., Porciuncula, L.O., Cimarosti, H., Batista, T. Rocha, J., Salbego, C.G., Souza, D.O., 2003. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. *Brain Res.* 986, 196-9.
- Goedert, M. Spillantini, M.G., Davies, S.W., 1998. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurobiol.* 8, 619-632.
- Gotow, T., Tanaka, T., Nakamura, Y., Takeda, M., 1994. Dephosphorylation of the largest neurofilament subunit protein influences the structure of crossbridges in reassembled neurofilaments. *J. Cell Sci.* 107, 1949-1957.
- Grant, P., Pant, H.C., 2000. Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. *J. Neurocytol.* 29, 843-872.
- Guidato, S., Tsai, L.H., Woodgett, J., Miller, C.C., 1996. Differential cellular phosphorylation of neurofilament heavy side arms by glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinase-5. *J. Neurochem.* 66, 1698-1706.
- Haller, W. S., Irgolic, K. J., 1972. Diaryl Ditellurides from Grignard-reagents and Elemental Tellurium. *J. Organomet. Chem.* 38, 97-103.
- Hashimoto, R., Nakamura, Y., Goto, H., Wada, Y., Sakoda, S., Kaibuchi, K., 1998. Domain- and site- specific phosphorylation of bovine NF-L by Rho-associated kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 245, 407-411.



- Hisanaga, S., Yasugawa, S., Yamakawa, T., Miyamoto, E., Ikebe, M., Uchiyama, M., Kishimoto, T., 1993. Dephosphorylation of microtubule-binding sites at the neurofilament-H tail domain by alkaline, acid, and protein phosphatases. *J. Biochem. (Tokio)* 113, 705-709.
- Hsieh, S.T., Kidd, G.J., Crawford, T.O., Xu, Z., Lin, W.M., Trapp, B.D., Cleveland, D.W., Griffin, J.W., 1994. Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J. Neurosci.* 14, 6392-6401.
- Inada, H., Goto, H., Tanabe, K., Nishi, Y., Kaibuchi, K., Inagaki, M., 1998. Rho-associated kinase phosphorylates desmin, the myogenic intermediate filament protein, at unique amino-terminal sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 21-25.
- Inagaki, M., Nishi, Y., Nishizawa, K., Matsuyama, M., Sato, C., 1987. Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. *Nature* 328, 649-652.
- Inagaki, M., Gonda, Y., Nishizawa, K., Kitamura, S., Sato, C., 1990. Ando, S. Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro located in a non-alpha-helical head domain. *J. Biol. Chem.* 265, 4722-4729.
- Inagaki, N., Tsujimura, K., Tanaka, J., Sekimata, M., Kamei, Y., Inagaki, M., 1996. Visualization of protein kinase activities in single cells by antibodies against phosphorylated vimentin and GFAP. *Neurochem. Res.* 21, 795-800.
- Jones, D.H., Matus, A.I., 1974. Isolation of plasma synaptic membrane from brain by combination flotation-sedimentation density gradient centrifugation. *Biochim. Biophys. Acta* 356, 276-287

- Jorgensen, P.L., 1986. Structure, function and regulation of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in the kidney. *Kidney Int.* 29, 10-20.
- Julien, J.P., 1999. Neurofilament functions in health and disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 554-560.
- Julien, J.P., Mushynski, W.E., 1998. Neurofilaments in health and disease. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 61, 1-23.
- Ku, N.O., Omary, M.B., 1997. Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431. *J. Biol. Chem.* 272, 7556-7564.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lapadula, D. M., Irwin, R. D., Suwita, E., Abou-Donia, M.B., 1986. Cross-linking of neurofilament proteins of rat spinal cord in vivo after administration of 2,5-hexanedione. *J. Neurochem.* 46, 1843-1850.
- Leterrier, J.F., Kas, J., Hartwig, J., Vegners, R., Janmey, P.A., 1996. Mechanical effects of neurofilament cross-bridges. Modulation by phosphorylation, lipids, and interactions with F-actin. *J. Biol. Chem.* 271, 15687-15694.
- Lopina, O.D., 2001. Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. *Biochemistry (Moscow)* 66, 1122-1131.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-267.
- Martin, R., Door, R., Ziegler, A., Warchol, W., Hahn, J., Breitig, D., 1999. Neurofilament phosphorylation and axon diameter in the squid giant fibre system. *Neuroscience* 88, 327-36.
- Meier, J., Couillard-Despres, S., Jacomy, H., Gravel, C., Julien, J.P., 1999. Extra neurofilament NF-L subunits rescue motor neuron disease caused by overexpression of the human NF-H gene in mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 1099-1110.
- Moore, E.D., Etter, E.F., Philipson, K.D., Carrington, W.A., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Fay, F.S., 1993. Coupling of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. *Nature* 365, 657-660.
- Moretto, M.B., Rossato, J.I., Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B., 2003. Voltage-dependent selenium and diorganochalcogenides inhibition of 45Ca<sup>2+</sup> influx into brain synaptosomes. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17, 154-60.
- Moretto, M. B., Funchal, C., Zeni, G., Pessoa-Pureur, R., Rocha, J.B.T., 2005a. Selenium compounds prevent the effects of methylmercury on the in vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex of young rats. *Tox. Sci.* 85, 639-646.
- Moretto, M.B., Funchal, C., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Pessoa-Pureur, R., 2005b. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. *Toxicol.* 210, 213-222.

- Nixon, R.A., Sihag, R.K., 1991. Neurofilament phosphorylation: a new look at regulation and function. *Trends Neurosci* 14, 501-506.
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem. Rev.* 104, 6255-6285.
- Paramio, J.M., Jorcano, J.L., 2002. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? *Bioessays* 24, 836-844.
- Paulmier, C., 1986. Selenium reagents and intermediates. In: *Organic Synthesis*. Pergamon, Oxford.
- Pearson, R. G., Sobel, H., Songstad, J., 1968. Nucleophilic reactivity constants toward methyl iodide and trans-[PT(PY)<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>]. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 319-326.
- Peter, M., Sanghera, J.S., Pelech, S.S., Nigg, E.A., 1992. Mitogen-activated protein kinases phosphorylate nuclear lamins and display sequence specificity overlapping that of mitotic protein kinase p34 cdc2. *Eur. J. Biochem.* 205, 287-294.
- Petragnani, N., 1994. Preparation of the principal classes of organic tellurium compounds. In: *Tellurium in Organic Synthesis*. Academic Press, London, pp. 9–88.
- Petzold, A., 2005. Neurofilament phosphoforms: Surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J. Neurol. Sci.* 233, 183-198.
- Pollenz, R. S., McCarthy, K.D., 1986. Analysis of cyclic AMP-dependent changes in intermediate filament protein phosphorylation and cell morphology in cultured astroglia. *J. Neurochem.* 47, 9-17.

- Rajasekaran, A.K., Rajasekaran, S.A., 2003. Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight junctions. *A. J. Physiol. Renal Physiol.* 285, F388-396.
- Shetty, K.T., Kink, W.T., Pant, H.C., 1993. Cdc-like kinase from rat spinal cord specifically phosphorylates KSPXK motifs in neurofilament proteins: isolation and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6844-6848.
- Sihag, R.K., Nixon, R.A., 1990. Phosphorylation of the amino terminal head domain of the middle molecular mass 145 kDa subunit of neurofilaments. *J. Biol. Chem.* 265, 4166-4171.
- Stangherlin, E.U., Favero, A.M., Weis, S.N., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C. W., 2006. Assessment of reproductive toxicity in male rats following acute and sub-chronic exposures to diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. *Food Chem. Toxicol.* 44, 662-669.
- Stangherlin, E.U., Favero, A.M., Weis, S.N., Zeni, G., Rocha, J.B.T., Nogueira, C., 2005. Teratogenic vulnerability of rat fetuses to diphenyl ditelluride: prenatal assessment. *Toxicol.* 207, 231-239.
- Sun, D., Leung, C.L., Liem, R.K.H., 1996. Phosphorylation of the high molecular weight neurofilament protein (NF-H) by Cdk5 and p35. *J. Biol. Chem.* 271, 14245-14251.
- Tanaka, J., Ogawara, M., Ando, S., Shibata, M., Yatani, R., Kusagawa, M., 1993. Phosphorylation of a 62 kd porcine alpha-internexin, a newly identified intermediate filament protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 115-123.

- Yudowski, G.A., Efendiev, R., Pedemonte, C.H., Katz, A., Berggren, P.-J., Bertorello, A., 2000. Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha subunit and regulates its trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6556-6561.
- Yufu, K., Itho, T., Edamatsu, R., Mori, A., Hirakawa, M., 1993. Effect of hyperbaric oxygenation on the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase and membrane fluidity on cerebro cortical membranes after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurochem. Res.* 16, 1033-1039.
- Walbran, B. B., Robins, E., 1978. Effects of central nervous system accumulation of tellurium on behavior in rats. *Pharmacol. Biochem Behav.* 9, 297-300.
- Widy-Tyszkiewicz, E., Piechal, A., Gajkowska, B., Smialek, M., 2002. Tellurium-induced cognitive deficits in rats are related to neuropathological changes in the central nervous system. *Toxicol. Lett.* 131, 203-214.
- Wyse, A.T.S., Streck, E.L., Worm, P., Wajner, A., Ritter, F., Netto, C.A., 2000. Preconditioning prevents the inhibition of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity after brain ischemia. *Neurochem. Res.* 25, 971-975.
- Wyse, A.T.S., Brusque, A.M., Silva, C.G., Streck, E.L., Wajner, M., Wannmacher, C.M.D., 1998. Inhibition of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> -ATPase from rat brain cortex by propionic acid. *Neuroreport* 9, 1719-1721.
- Woroniccki, R., Ferdinand, J.R., Morrow, J.S., Devarajan, P., 2003. Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia. *Am.J. Physiol. Renal Physiol.* 284, F358-364.

Zeni, G. R., Formiga, H., Comasseto, J.V., 2000. Improved Procedure for the Hydrotelluration of alkynes. *Tetrahedron Lett.* 41, 1311-1313.

Zeni, G.R., Barros, O.S., Do Rego, Moro, A.V., Braga, A.L., Peppe, C., 2003. Hydroteluration of Aminoalkynes. *Chem. Communications* 11, 1258-1259.

Zeni, G. R., Stracke, M. P., Nogueira, C.W., Braga, A. L., Menezes, P. H., Stefani, H. A., 2004. Hydroselenation of Alkynes by Lithium Butylselenolate: An Approach in the Synthesis of Vinylic Selenides. *Organic Lett.* 6, 1135-1138.

**Figure 1.** Effect of *in vivo* treatment with different concentrations of diphenyl ditelluride on body mass gain of suckling rats. Rats were treated with a single subcutaneous injection of (PheTe)<sub>2</sub> at different concentrations or canola oil (2.8 ml/kg body weight). Body mass measurements were obtained daily up to day 6 after (PheTe)<sub>2</sub> administration. Data expressed as percentage of gain of mass body are reported as means ± S.E.M. of eight to ten animals obtained from different litters. Statistically significant differences from controls, as determined by one-way ANOVA followed by LSD test are indicated: \*\*P< 0.01; \*\*\*P< 0.001.

**Figure 2.** Effect of *in vivo* treatment with diphenyl ditelluride on the *in vitro* phosphorylation of IF proteins in cerebral cortex and hippocampus of rats. Animals were treated with a single subcutaneous injection of (PheTe) (0.3 μmol/Kg body weight) or canola oil (2.8 ml/kg body weight). Slices of cerebral cortex were incubated in the presence of <sup>32</sup>P orthophosphate, the high-salt Triton insoluble cytoskeletal fraction was extracted and the radioactivity incorporated into IF subunits was measured as described in Material and Methods. A, B, C and D, cerebral cortex; E, F, G and H, hippocampus. NF-M, middle molecular weight neurofilament subunit; NF-L, low molecular weight neurofilament subunit; Vim, vimentin and GFAP, glial fibrillary acidic protein. Data are reported as means ± S.E.M. of eight to ten animals and are expressed as arbitrary units. Statistically significant differences from controls, as determined by one-way ANOVA followed by LSD test are indicated: \*P< 0.05; \*\*P< 0.01; \*\*\*P<0.001.

**Figure 3.** Effect of *in vivo* treatment with diphenyl ditelluride on IF proteins immunoreactivity in total homogenate and in the cytoskeletal fraction from cerebral cortex at day 3 (A) and day 6 after treatment (B). Animals were treated with a single subcutaneous



injection of (PheTe) (0.3 $\mu$ mol/Kg body weight) or canola oil (2.8 ml/kg body weight) and the IF-enriched cytoskeletal fraction was extracted. Samples of tissue homogenate or cytoskeletal fraction were analyzed by SDS-PAGE. All lanes received an equivalent amount of protein (80  $\mu$ g for tissue homogenate and 50  $\mu$ g for cytoskeletal fraction). Membranes were treated with the monoclonal antibodies: anti phospho NF-H (clone NE-14) diluted 1:1000, anti total NF-H (clone N-52) diluted 1:1000, anti NF-150 (clone NN-18) diluted 1:500, anti NF-68 (clone NR-4) diluted 1:1000, anti vimentin (clone vim 13.2) diluted 1:400 and anti glial fibrillary acidic protein (GFAP) (clone G-A-5) diluted 1:400. Scans from 4 different animals were quantified as described in Material and Methods and for each animal the area of control samples was referred to as 100%. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistically significant differences were determined by one-way ANOVA followed by LSD test are indicated: \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001. NF-H, high molecular weight neurofilament subunit; NF-H (P), phosphorylated high molecular weight neurofilament subunit; NF-M, middle molecular weight neurofilament subunit; NF-L, low molecular weight neurofilament subunit; Vim, vimentin and GFAP, glial fibrillary acidic protein. The blots were developed using an ECL kit.

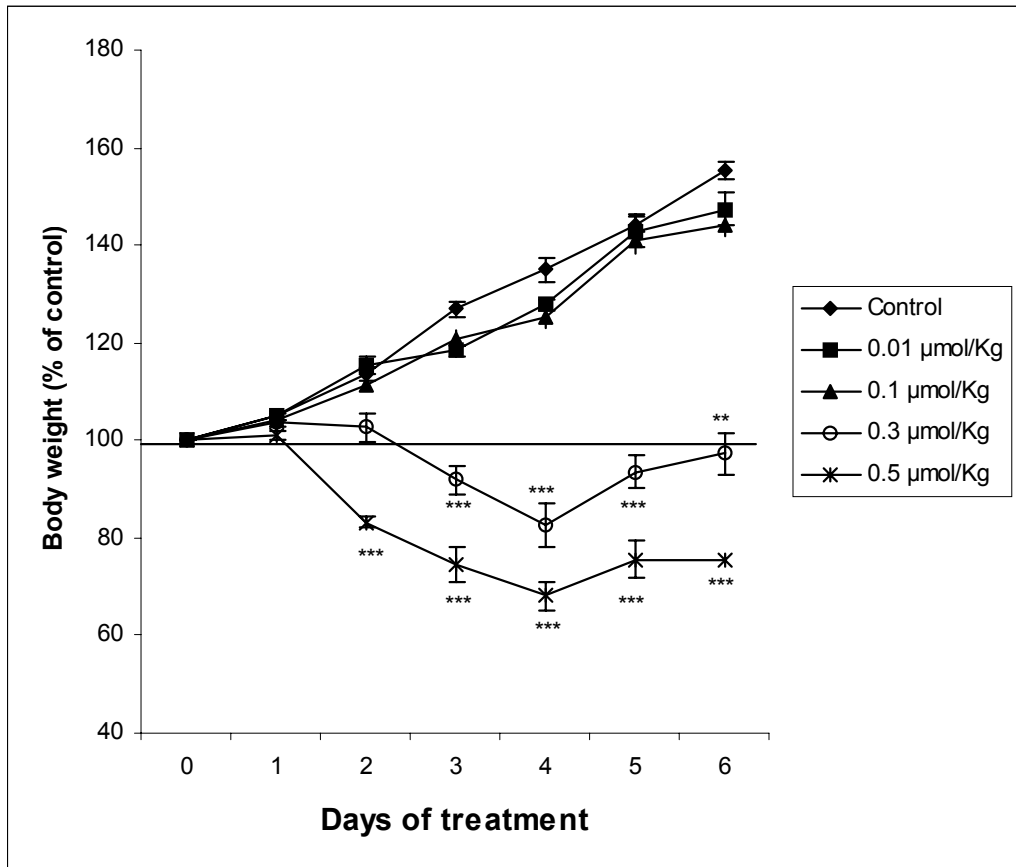
**Figure 4.** Effect of in vivo treatment with diphenyl ditelluride on GFAP immunoreactivity in total homogenate and in the cytoskeletal fraction from rat hippocampus at day 6 after treatment. Animals were treated with a single subcutaneous injection of (PheTe)<sub>2</sub> (0.3 $\mu$ mol/Kg body weight) or canola oil (2.8 ml/kg body weight) and the IF-enriched cytoskeletal fraction was extracted. Samples of tissue homogenate or cytoskeletal fraction were analyzed by SDS-PAGE. All lanes received an equivalent amount (80  $\mu$ g for tissue homogenate and 50  $\mu$ g for cytoskeletal fraction) of protein. Membranes were treated with the monoclonal antibody anti glial fibrillary acidic protein (GFAP) (clone G-A-5) diluted 1:400. Scans from 4 different animals were quantified as described in Material and Methods and for

each animal the area of control samples was referred to as 100%. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.. Statistically significant differences determined by one-way ANOVA followed by LSD test are indicated: \*\*P<0.01. The blots were developed using an ECL kit.

**Figure 5.** Neuroprotective effect of diphenyl diselenide against the in vivo effects of diphenyl ditelluride on the phosphorylation of intermediate filament subunits from cerebral cortex of rats. Animals were treated with a single subcutaneous injection of (PheTe)<sub>2</sub> (0.3 $\mu$ mol/Kg body weight) or canola oil (2.8 ml/kg body weight) and 24 h after the (PheTe)<sub>2</sub> administration, animals were treated with a single subcutaneous injection of (PheSe)<sub>2</sub> (5 $\mu$ mol/kg body weight). Slices of cerebral cortex were incubated in the presence of <sup>32</sup>P orthophosphate, the high-salt Triton insoluble cytoskeletal fraction was extracted and the radioactivity incorporated into intermediate filament subunits was measured as described in Material and Methods. NF-M, middle molecular weight neurofilament subunit; NF-L, low molecular weight neurofilament subunit; Vim, vimentin; GFAP, glial fibrillary acidic protein. Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. of six to eight animals expressed as percentage of controls. Statistically significant differences from controls, as determined by one-way ANOVA followed by LSD test, are indicated: \*P<0.001 from control; #P<0.05 from (PheTe)<sub>2</sub>; ##P<0.001 from (PheTe)<sub>2</sub>; @P<0.05 from (PheSe)<sub>2</sub>.

**Figure 6.** Effect of in vivo treatment with diphenyl ditelluride on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in synaptic plasma membrane from cerebral cortex of rats. Animals were treated with a single subcutaneous injection of (PheTe)<sub>2</sub> (0.3 $\mu$ mol/Kg body weight) or canola oil (2.8 ml/kg body weight). Enzymatic activity was measured at days 3 and 6 after treatment, as described in Material and Methods. Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. of six to eight animals. Statistically significant differences from controls, as determined by one-way ANOVA followed by LSD test, are indicated: \*P<0.01.

Figure 1



**Figure 2**

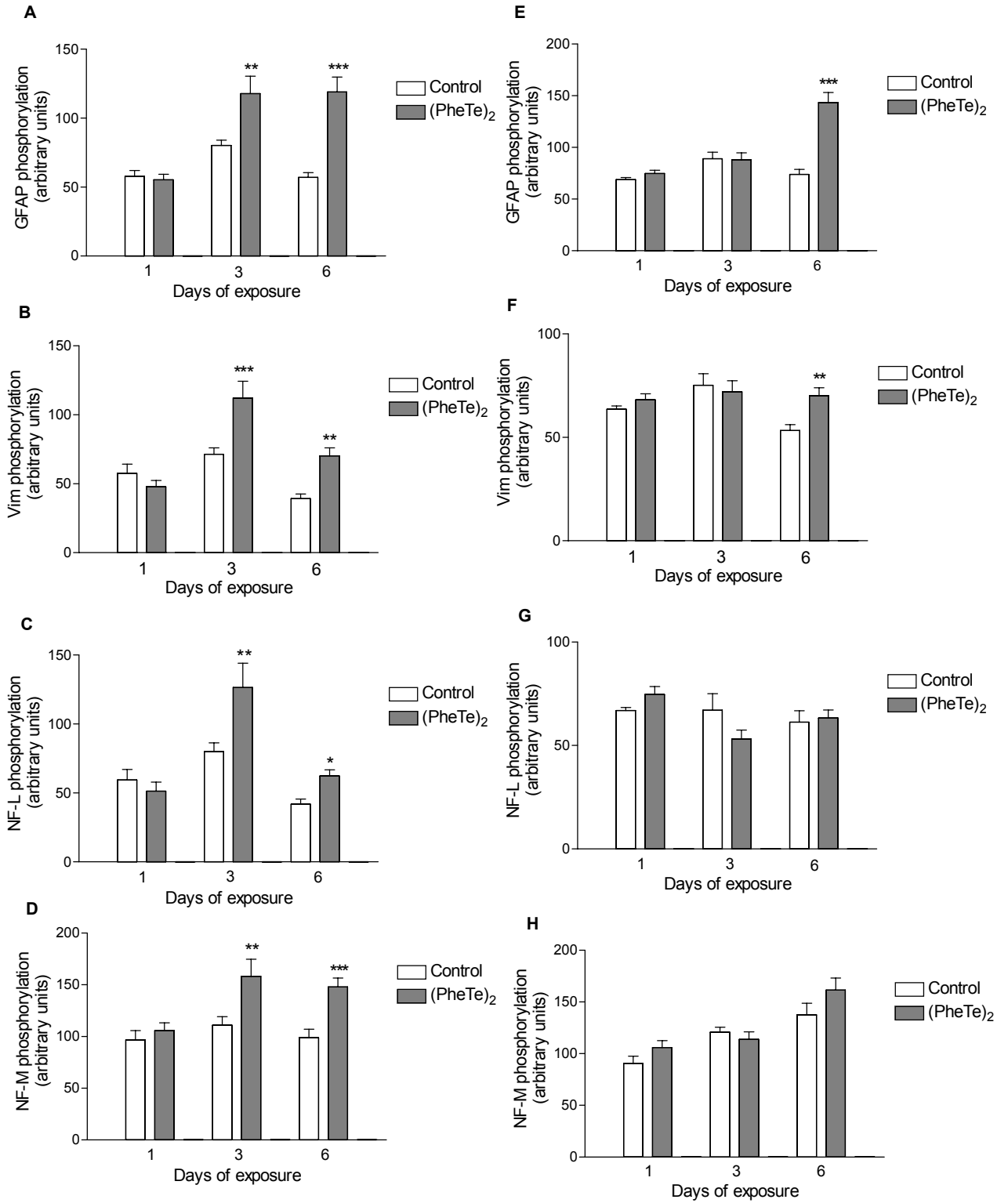


Figure 3

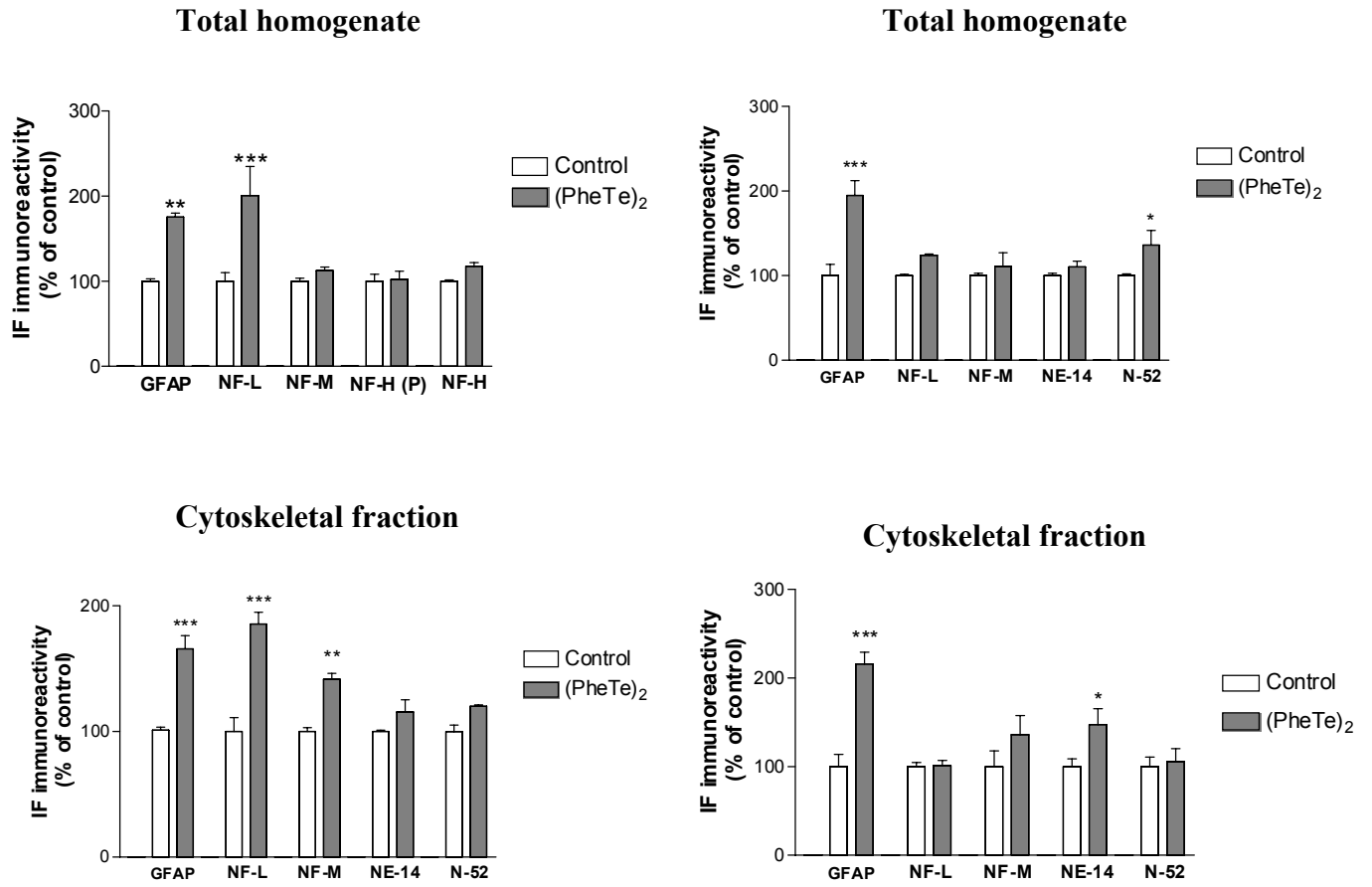


Figure 4

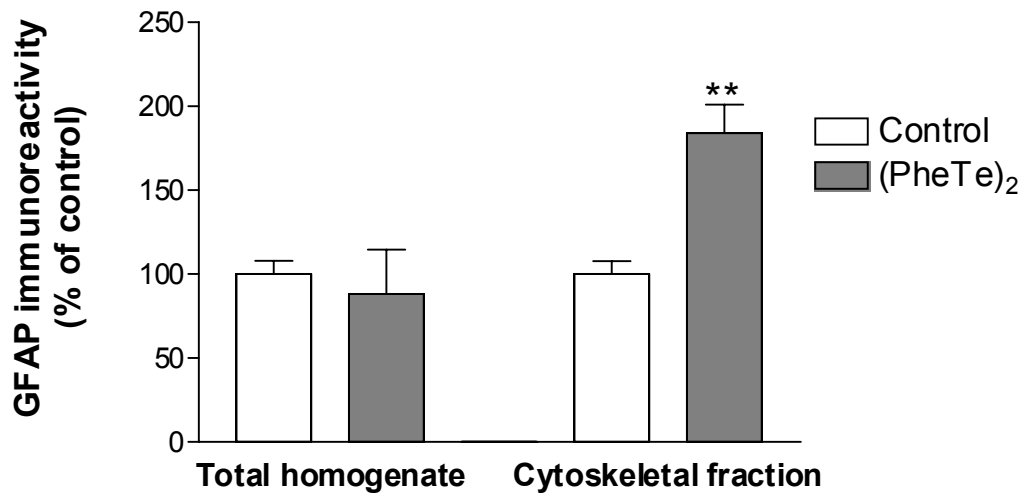
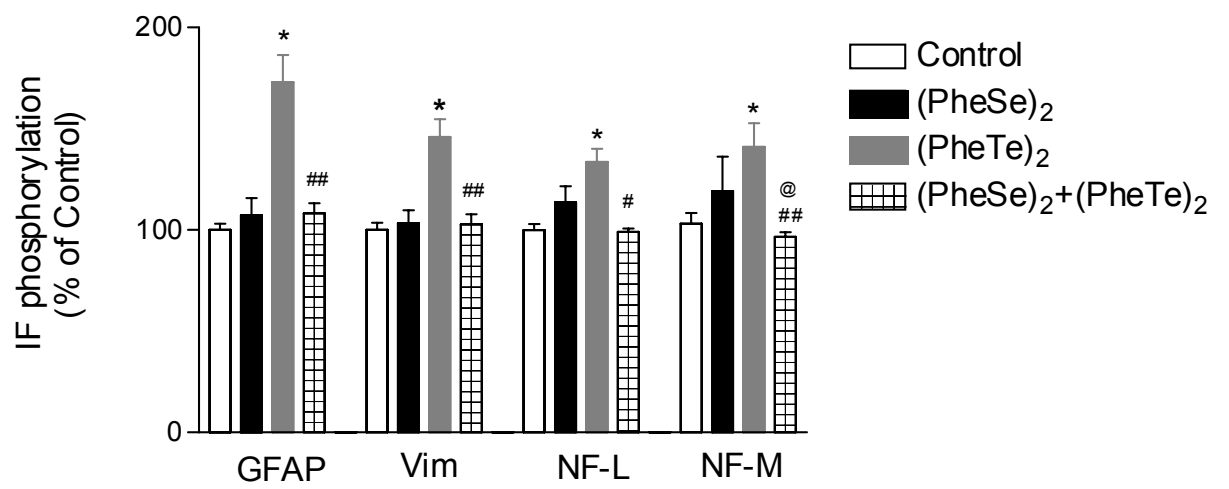
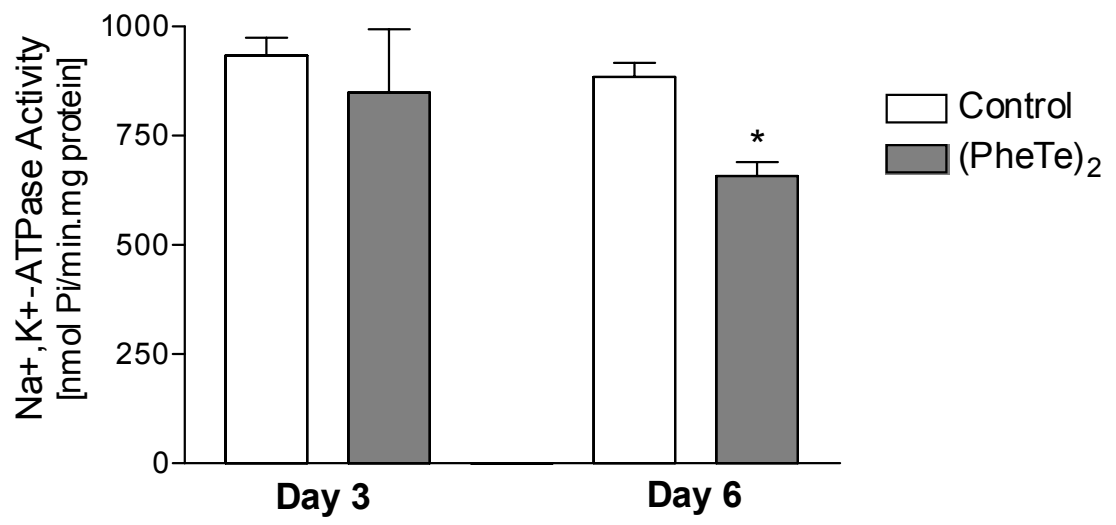


Figure 5



**Figure 6**





### PARTE III

## 1. DISCUSSÃO

O telúrio é um elemento traço usado como componente industrial de muitas ligas e na indústria eletrônica. Na forma de telureto de hidrogênio ( $H_2Te$ ) pode ser absorvido pelas proteínas (por exemplo, proteínas da pele, do cabelo e de roupas de lã) e apresenta uma taxa de eliminação muito lenta (Russel, 1992). O telúrio é uma substância tóxica que pode conduzir a sintomas neurológicos, como diminuição do aprendizado e da memória espacial (Walbran & Robins, 1978; Widy-Tyszkiewicz *et al.*, 2002), toxicidade reprodutiva (Stangherlin *et al.*, 2006) e desmielinização do sistema nervoso periférico (Wagner-Recio *et al.*, 1991; Laden e Porter, 2001). Além disso, o composto orgânico de telúrio  $(PheTe)_2$  pode afetar o sistema glutamatérgico (Nogueira *et al.*, 2001; Borges *et al.*, 2004) e a atividade de enzimas, como a delta-aminolevulinato desidratase em diferentes tecidos (Maciel *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2003c). Também foi demonstrado que o  $(PheTe)_2$  inibe a atividade da  $Na^+K^+$ -ATPase *in vitro* (Borges *et al.*, 2005).

Contudo, o efeito desse elemento sobre as proteínas do citoesqueleto é muito pouco conhecido. No entanto, foi previamente demonstrado em nosso laboratório que fatias de córtex cerebral de ratos jovens expostas a uma concentração tóxica do  $(PheTe)_2$  apresentaram um aumento da fosforilação *in vitro* das proteínas dos FI associadas à fração citoesquelética. Além disso, esse efeito foi prevenido pelos compostos de selênio, ebselen e  $(PheSe)_2$  (Moretto *et al.* 2005b). Entretanto, até o presente momento, não há evidências do efeito *in vivo* dessa neurotoxina sobre a atividade da  $Na^+K^+$ -ATPase ou sobre a fosforilação de proteínas do citoesqueleto em diferentes estruturas cerebrais, nem da habilidade dos compostos de selênio em proteger os tecidos contra os efeitos da administração subcutânea do  $(PheTe)_2$ .

No presente estudo, estabeleceu-se inicialmente a dose tóxica do composto, analisando-se as características físicas dos animais. Para isso, diferentes concentrações de  $(PheTe)_2$  foram injetadas em ratos de 15 dias de idade e esses animais foram acompanhados por 6 dias

consecutivos. Após isso, relacionou-se o tempo de latência e a concentração de (PheTe)<sub>2</sub> utilizada com ação deste composto sobre os parâmetros estudados. Como critério para a determinação da toxicidade utilizou-se a medida do peso corporal. Analisando os resultados, observou-se uma significativa perda de massa corporal após a exposição aguda ao (PheTe)<sub>2</sub> nas concentrações de 0,3 ou 0,5 µmol/Kg de peso corporal, começando no dia 2 após a injeção para a concentração 0,5 µmol/Kg e no dia 3 para a concentração de 0,3 µmol/Kg de peso corporal. Esse efeito persistiu até 6 dias após a exposição à droga para ambas as concentrações, indicando provavelmente uma toxicidade sistêmica nessas concentrações. A perda de massa corporal foi previamente relatada para o (PheTe)<sub>2</sub> por Stangherlin *et al.* (2006), que descreveu que ratos adultos machos submetidos a uma exposição aguda de (PheTe)<sub>2</sub> apresentam uma significativa perda de peso nos dias 3 e 5 após a injeção.

Levando em consideração, então, os dados obtidos e o que está descrito na literatura, escolheu-se utilizar a concentração de (PheTe)<sub>2</sub> de 0.3 µmol/Kg de peso corporal, bem como os dias 1, 3 e 6 após a exposição à droga para estudos posteriores, que tinham como objetivo verificar o efeito da administração subcutânea de (PheTe)<sub>2</sub> sobre a fosforilação de proteínas do citoesqueleto e sobre a atividade da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase.

Neste trabalho, foi demonstrado que ratos jovens submetidos a uma injeção aguda de (PheTe)<sub>2</sub> apresentaram uma hiperfosforilação das subunidades dos FI, NF-H, NF-M, NF-L, vimentina e GFAP, do córtex cerebral, 3 e/ou 6 dias após o tratamento. Isso pode estar refletindo uma atividade alterada do sistema fosforilante endógeno associado às proteínas dos FI na estrutura cerebral estudada. Por outro lado, a fosforilação *ex vivo* das proteínas do citoesqueleto no hipocampo dos mesmos animais foi afetada em menor extensão. Apenas as proteínas de FI presentes nos astrócitos, vimentina e GFAP, sofreram hiperfosforilação e esse efeito foi observado somente 6 dias após a injeção da neurotoxina. Esses resultados sugerem que as proteínas do citoesqueleto do córtex cerebral e do hipocampo apresentam uma susceptibilidade diferente à exposição aguda a essa droga neurotóxica. Embora não se

conheça ainda o mecanismo associado a esses efeitos, eles provavelmente estão relacionados com respostas específicas desencadeadas pelo (PheTe)<sub>2</sub> em neurônios e astrócitos de córtex e hipocampo de ratos jovens.

No córtex cerebral, a hiperfosforilação que ocorreu 3 dias após a administração do (PheTe)<sub>2</sub> foi acompanhada por um aumento do imunocontéudo de GFAP e NF-L, tanto no homogeneizado total quanto na fração citoesquelética insolúvel em um tampão de alta força iônica. Pode-se tentar explicar esses resultados sugerindo que, no córtex cerebral o (PheTe)<sub>2</sub>, de alguma maneira, aumenta a expressão ou altera o “turnover” dessas proteínas, conduzindo ao acúmulo da forma hiperfosforilada associada ao citoesqueleto. Isso pode estar representando uma polimerização *in vivo* ou uma agregação das proteínas de FI (Funchal *et al.*, 2003). Por outro lado, ocorreu um aumento do imunocontéudo da subunidade NF-M apenas na fração citoesquelética. Analisando esse resultado, pode-se supor que esteja ocorrendo uma alteração no equilíbrio de polimerização/despolimerização dessa subunidade, levando a um aumento da forma polimerizada e conseqüentemente um aumento da quantidade de NF-M na fração citoesquelética insolúvel em tampão de alta força iônica. Quando as proteínas encontram-se na sua forma polimerizada elas tendem a permanecer na fração insolúvel, no entanto, as subunidades são encontradas em maior quantidade na fração solúvel.

O aumento do imunocontéudo dos FI no córtex cerebral foi aparentemente mais persistente em astrócitos do que em neurônios, como está evidenciado pelo aumento do imunocontéudo da GFAP 6 dias após a exposição à droga, sem haver alteração no imunocontéudo dos neurofilamentos NF-L e NF-M. Isso sugere que possa estar ocorrendo gliose reativa em conseqüência ao dano neuronal induzido pela hiperfosforilação dos neurofilamentos. Além disso, o aumento do imunocontéudo da NF-H fosforilada, observado na fração citoesquelética enriquecida em FI no dia 6 após o tratamento, parece ser um efeito transitório que está relacionado com a mudança na estequiometria das subunidades protéicas dos neurofilamentos, a qual tem sido descrita em outras condições patológicas, como nas

funções anormais dos neurônios motores espinhais (Meier *et al.*, 1999). A hiperfosforilação da NF-H pode também bloquear mecanicamente o transporte axonal, interferindo com a “maquinaria” que realiza esse transporte ao longo do axônio (Grant & Pant, 2000).

A alta susceptibilidade à neurotoxinas do sistema fosforilante associado aos FI de córtex cerebral de ratos, foi previamente demonstrada em estudos *in vitro* usando fatias do tecido expostas ao metilmercúrio (Moretto *et al.*, 2005a) e a metabólitos que se acumulam em distúrbios relacionados com o metabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (Funchal *et al.*, 2002; Funchal *et al.*, 2005). Além disso, alterações no sistema fosforilante também foram demonstradas em estudos *in vivo*, nos quais os ácidos propiônico e metilmalônico diminuem a fosforilação das proteínas do citoesqueleto (de Almeida *et al.*, 2003). Neste contexto, tem sido largamente descrito que alterações no sistema de fosforilação/desfosforilação das proteínas do citoesqueleto podem ter sérias conseqüências para a função e estrutura celular, bem como podem estar relacionados com danos neuronais e com várias doenças neurodegenerativas (Goedert *et al.*, 1998; Julien & Mushynski, 1998; Julien 1999).

Por outro lado, no hipocampo, a hiperfosforilação da GFAP, observada 6 dias após o tratamento, não foi acompanhada por um aumento do imunoconteúdo dessa proteína no homogeneizado total, apesar de haver um aumento na imunoreatividade na fração citoesquelética. Isso pode sugerir que possa estar ocorrendo uma alteração no equilíbrio de polimerização/despolimerização da GFAP. Essa possibilidade é suportada por evidências de que as propriedades dinâmicas das proteínas dos FI são reguladas por fosforilação, que por sua vez, parece conduzir a uma reorganização intracelular de FI (Inagaki *et al.*, 1996b). Além disso, a reorganização da GFAP foi descrita em culturas de astrócitos em resposta a uma hiperfosforilação dependente da proteína quinase A. Essa reorganização da GFAP resultou em mudanças morfológicas dessas células (Pollenz & McCarthy, 1986).

Levando em consideração as respostas do citoesqueleto decorrentes da injúria provocada pelo (PheTe)<sub>2</sub> no hipocampo, pode-se sugerir que os neurônios hipocâmpais apresentam uma menor vulnerabilidade à neurotoxina utilizada do que os astrócitos. Isso foi evidenciado pelos níveis inalterados de fosforilação das proteínas de FI neuronais e é suportado pelo imunoconteúdo total de GFAP que também está inalterado. Esses resultados não são consistentes com a hipótese da gliose reativa (Briones *et al.*, 2006), indicando que isso provavelmente não esteja ocorrendo no hipocampo.

Analisando os resultados obtidos, pode-se supor que o efeito do tratamento agudo com (PheTe)<sub>2</sub> sobre o sistema fosforilante associado aos FIs precede a reorganização das proteínas de FI hiperfosforiladas. Essa possibilidade é suportada pelas evidências de que a fosforilação pode regular as propriedades dinâmicas dos FIs, conduzindo assim a uma reorganização da rede de FIs (Inagaki *et al.*, 1996b). Além disso, a hiperfosforilação patológica das proteínas do citoesqueleto está relacionada com agregados de elementos do citoesqueleto em diferentes compartimentos celulares, sendo essa uma das características de doenças neurodegenerativas (Petzold, 2005).

Alterações no sistema fosforilante podem ser muito prejudiciais à célula, portanto é importante descobrir maneiras de prevenir esse efeito. Por essa razão, verificamos nesse trabalho se o composto de selênio análogo ao (PheTe)<sub>2</sub>, o (PheSe)<sub>2</sub>, seria capaz de prevenir o aumento na fosforilação das proteínas do citoesqueleto, que ocorreu no córtex cerebral de ratos jovens 3 dias após a exposição ao (PheTe)<sub>2</sub>. Estudos prévios obtidos em nosso grupo já tinham demonstrado que os compostos orgânicos de selênio, ebselen e (PheTe)<sub>2</sub>, previnem o efeito estimulatório do (PheTe)<sub>2</sub> *in vitro* sobre a fosforilação das proteínas de FI em fatias de córtex cerebral de ratos jovens (Moretto *et al.* 2005b). Os resultados obtidos no atual trabalho mostraram que uma injeção subcutânea de (PheSe)<sub>2</sub> 24 h após a administração do (PheTe)<sub>2</sub> preveniu o efeito estimulatório induzido pelo composto orgânico de telúrio sobre a fosforilação dos FI. É importante enfatizar que o composto de selênio *per se* foi incapaz de

alterar os níveis de fosforilação das proteínas de FIs quando injetado sozinho. Contudo, compostos de selênio não são capazes de proteger apenas o sistema fosforilante, pois há vários estudos na literatura relatando o efeito protetor dessas substâncias em outras alterações metabólicas. Esses compostos podem proteger as células contra a excitotoxicidade provocada pelo glutamato (Porciúncula *et al.*, 2001), a peroxidação lipídica (Meotti *et al.*, 2004) e ajudar na proteção contra a neurodegeneração que ocorre na isquemia cerebral (Ansari *et al.*, 2004). É importante salientar, entretanto, que essas últimas duas ações podem representar um efeito indireto dos compostos de selênio, uma vez que tanto a isquemia cerebral, quanto a peroxidação lipídica podem ser consequência de alterações do sistema glutamatérgico.

Os mecanismos envolvidos com os efeitos induzidos pelo (PheTe)<sub>2</sub> ou com o efeito protetor dos compostos de selênio, ainda não estão elucidados. Pode-se especular que o composto de telúrio possa estar sendo transformado em seu intermediário reduzido: o fenil telurol (benzenotelurol) (Zeni *et al.*, 2000, 2003, 2004), o qual é um potente agente nucleofílico. Este intermediário pode atacar o sistema de fosforilação/desfosforilação das proteínas de FI, ativando-as por um mecanismo redox. O efeito protetor do (PheSe)<sub>2</sub> contra o efeito estimulatório do (PheTe)<sub>2</sub> pode estar relacionado com o potencial mais fraco dos intermediários selenóis como agentes redutores quando comparados com seu análogo telurol (Pearson *et al.*, 1968; Haller & Irgolic, 1972). Além disso, ele pode competir com o (PheTe)<sub>2</sub> pelo sistema celular que origina a forma nucleofílica desse calcogênio. Entretanto, mais experimentos são necessários para esclarecer esse ponto.

Os resultados obtidos nesse trabalho também mostraram que o tratamento agudo com (PheTe)<sub>2</sub> inibe a atividade da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos jovens. Um efeito similar foi observado *in vitro* para homogeneizado total de cérebro de ratos adultos e esse efeito foi atribuído a interação dos organocalcogênios com os resíduos cisteínicos da Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase, que são importantes para a atividade da enzima (Borges

*et al.*, 2005). A importância dos grupos tióis para a atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase já foi previamente descrita. Estudos mostraram que a glutathiona, um agente redutor de grupos tióis, é capaz de prevenir o efeito inibidor da homocisteína (Streck *et al.*, 2001) e da prolina (Franzon *et al.*, 2003) sobre a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase cerebrais em ratos (Streck *et al.*, 2001; Franzon *et al.*, 2003), indicando que o grupo sulfidril é importante para a função crítica da enzima. De fato, os grupos  $-\text{SH}$  da enzima são altamente susceptíveis ao estresse oxidativo (Yufu *et al.*, 1993) e a agentes oxidantes (Carfagna *et al.*, 1996).

Não se pode excluir, no entanto, a possibilidade de que a hiperfosforilação das proteínas do citoesqueleto possa estar implicada com o decréscimo da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, uma vez que a modulação da bomba de sódio em células vivas envolve a associação/dissociação com as proteínas do citoesqueleto (Casale *et al.*, 2003; Rajasekaran & Rajasekaran, 2003; Woroniecki *et al.*, 2003; Casale *et al.*, 2005). Além disso, a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase pode ser modulada por fosforilação mediada por várias quinases (Bertorello *et al.*, 1991; Feraille *et al.*, 1999; Fotis *et al.*, 1999; Yudowski *et al.*, 2000), mas as consequências dessa fosforilação para a atividade da enzima é ainda desconhecida (Lopina *et al.*, 2001). Então, pode-se supor que a ativação de proteínas quinases induzida pelo  $(\text{PheTe})_2$  poderia fosforilar, além das proteínas do citoesqueleto, a  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase, levando à inibição da enzima.

Em resumo, os resultados mostraram que o tratamento *in vivo* com  $(\text{PheTe})_2$ , um composto orgânico do telúrio neurotóxico, ativa o sistema fosforilante associado ao citoesqueleto em córtex cerebral e hipocampo de ratos jovens. Além disso, os resultados sugerem que o córtex é mais sensível a ação dessa neurotoxina do que o hipocampo. Também observou-se que a ação neurotóxica dessa droga em córtex cerebral inclui a inibição da atividade da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase.

Visto que a inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase pode conduzir a um aumento intracelular das concentrações de cálcio (Moore *et al.*, 1993) e que o citoesqueleto é muito importante para



formação e manutenção da forma celular e para o transporte axonal (Alberts *et al.*, 2002), presume-se que alterações no citoesqueleto e inibição da  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase podem, provavelmente, contribuir para a ação deletéria dessa toxina no cérebro, um fato que pode explicar, pelo menos em parte, a neurotoxicidade do  $(\text{PheTe})_2$ .

## 2. CONCLUSÃO

### 2.1. CONCLUSÃO GERAL

As alterações no citoesqueleto e a inibição da  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ATPase, efeitos esses desencadeados pelo tratamento *in vivo* com  $(\text{PheTe})_2$ , podem estar envolvidos com a neurotoxicidade do composto orgânico de telúrio.

### 2.2. CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

- O tratamento *in vivo* com  $(\text{PheTe})_2$  provoca uma significativa diminuição no ganho de massa corporal nas concentrações 0,3 e 0,5  $\mu\text{mol/Kg}$  de peso corporal.
- A administração subcutânea de  $(\text{PheTe})_2$  aumenta a fosforilação das subunidades NF-M, NF-L, GFAP e vimentina 3 e 6 dias após a exposição à droga em córtex cerebral de ratos jovens, bem como da subunidade NF-H, 6 dias após a administração do composto.
- No hipocampo, o tratamento *in vivo* com  $(\text{PheTe})_2$  aumenta a incorporação *in vitro* de  $^{32}\text{P}$ -ortofosfato nos FIs presentes em proteínas gliais, GFAP e vimentina, e isso ocorre somente 6 dias após a administração da droga.
- No córtex cerebral, a administração aguda de  $(\text{PheTe})_2$  altera o imunocontéudo das proteínas de FIs de maneira dependente do tempo de exposição à droga. Três dias após a administração do  $(\text{PheTe})_2$  ocorre um aumento do imunocontéudo das proteínas NF-M, NF-L e GFAP na fração citoesquelética, bem como das proteínas NF-L e GFAP no homogeneizado total. No entanto, 6 dias após a injeção do composto verifica-se apenas um

aumento do imunocontéudo da proteína GFAP na fração citoesquelética, assim como das proteínas NF-H e da GFAP no homogeneizado total.

- O imunocontéudo da proteína GFAP presente na da fração citoesquelética obtida de fatias de hipocampo de ratos jovens aumenta no sexto dia após a administração do (PheTe)<sub>2</sub>. Por outro lado, não ocorre alteração no imunocontéudo dessa mesma proteína no homogeneizado total obtido de fatias de hipocampo.
- Uma injeção subcutânea de (PheSe)<sub>2</sub> 24 h após a administração do (PheTe)<sub>2</sub> previne o efeito desencadeado pelo composto orgânico de telúrio sobre o sistema fosforilante associado ao citoesqueleto
- A administração aguda de (PheTe)<sub>2</sub> inibe significativamente a atividade da enzima Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase em membrana plasmática sináptica de córtex cerebral de ratos jovens. Essa inibição ocorre somente 6 dias após a administração da droga, não existindo nenhuma alteração significativa na atividade da enzima 3 dias após a injeção do composto.

### 3. PERSPECTIVAS

Este trabalho abre inúmeras perspectivas. Entre elas podemos citar:

1. Estudar o efeito do tratamento *in vivo* com (PheTe)<sub>2</sub> sobre a fosforilação de proteínas de filamentos intermediários em outras estruturas cerebrais, como cerebelo.
2. Realizar um estudo ontogenético do efeito *in vitro* do (PheTe)<sub>2</sub> sobre a fosforilação de proteínas do citoesqueleto de hipocampo e córtex cerebral de ratos.
3. Identificar as possíveis quinases e fosfatases envolvidas nesse efeito.
4. Investigar o possível envolvimento da via das MAPK no efeito desencadeado pela droga.
5. Verificar o envolvimento de diferentes neurotransmissores, como o glutamato e o Gaba, bem como a participação de segundos mensageiros, como AMPc e cálcio, nos efeitos do (PheTe)<sub>2</sub> sobre o citoesqueleto.
6. Relacionar as alterações causadas pelo (PheTe)<sub>2</sub> sobre a fosforilação dos FI com a reorganização do citoesqueleto em culturas de astrócitos e em linhagens de células C6.
7. Verificar o possível papel neuroprotetor do (PheSe)<sub>2</sub> sobre os efeitos desencadeados pelo (PheTe)<sub>2</sub> em culturas de astrócitos e linhagens de células C6
8. Realizar estudos de neuroproteção utilizando antioxidantes e outros agentes neuroprotetores

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERLEY, S.; GRIERSON, A.J.; BROWNLEES, J.; THORNHIEL, P.; ANDERTON, B.H.; LEIGHT, P.N.; SHEW, C.E. & MIELERC, C.J. Glutamate slow axonal transport of neurofilaments in transfected neurons. J. Cell Biol., 150: 165-175, 2000.
- ACKERLEY, S.; THORNBILL, P.; GRIERSON, A.J.; BROWNLEES, J.; ANDERTON, B.H.; LEIGH, P.N.; SHAW, C.E. & MILLER, C.C. Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. J. Cell Biol., 161: 489-495, 2003.
- ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K. & WALTER P. The cytoskeleton. In: Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M, Roberts K, Walter P. (EDS) Molecular Biology of the Cell., 4. ed. New York: Garland Science, 2002, pp. 907-982.
- AL-CHALABI, A.; ANDERSEN, P. M.; NILSSON, P.; CHIOZA, B.; ANDERSSON, J. L.; RUSS, C.; SHAW, C. E.; POWELL, J. F. & LEIGH, P. N. Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. Hum. Mol. Genet., 8: 157-164, 1999.
- ANDERSSON, C.M.; BRATTSAND, R.; HALLBERG, A.; ENGMAN, L.; PERSSON, J.; MOLDEUS, P. & COTGREAVE, I. Diaryl tellurides as inhibitors of lipid peroxidation in biological and chemical systems. Free Radic Res., 20:401-10, 1994.
- ANSARI M.A.; AHMAD A.S.; AHMAD M.; SALIM S.; YOUSUF S.; ISHRAT T. & ISLAM F. Selenium protects cerebral ischemia in rat brain mitochondria. Biol Trace Elem Res., 101:73-86, 2004.
- ARANDA-ESPINOZA, H.; CARL, P.; LETERRIER, J.F.; JANMEY, P. & DISCHER, D.E. Domain unfolding in neurofilament sidearm: effects of phosphorylation and ATP. FEBS Lett., 531: 397-401, 2002.

- BARBOSA, N.B.V.; ROCHA, J.T.B.; ZENI,G.; EMANUELLI, T.; BEQUE, M.C. & BRAGA, A.L. Effect of organic forms of selenium on  $\delta$ -aminolevulinic dehydratase from liver, kidney, and brain of adults rats. Toxicol. Appl Pharmacol., 149: 243-253, 1998.
- BEAR, M.F.; CONNORS, B.W. & PARADISO, M.A. Neurociência: desvendando o Sistema Nervoso. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002, pp. 143-157. cap. 6. Sistema de neurotransmissores.
- BERTORELLO, A.M.; APERIA, A.; WALAAS, S.I.; NAIRN, A.C. & GREENGARD, P. Phosphorylation of the catalytic subunit of  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase inhibits the activity of the enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci., 88, 11359-11362, 1991.
- BERTORELLO, A.M. & KATZ, A.I., Regulation of  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -pump activity: pathways between receptors and effectors. NIPS., 10: 253-259, 1995.
- BETTS, J.C.; BLACKSTOCK, W.P.; WARDS, M.A. & ANDERTON, B.H. Identification of phosphorylation sites on neurofilament proteins by nanoelectrospray mass spectrometry. J. Biol. Chem., 272:12922-12927, 1997.
- BHAT, NR. Signal transduction mechanisms in glial cells. Develop. Neurosci., 17: 267-284, 1995.
- BJÖRNSTEDT, M.; ODLANDER, B.; KUPRIN, C.; CLAEISSON, H.E. & HOLMGREN, A. 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, 35: 8511-8516, 1996.
- BOLDYREV, A.A.  $\text{Na}^+\text{K}^+$ ATPase. In: Sci. Technol., v. 17, 1985, pp 5-120.
- BORGES V.C.; NOGUEIRA C.W.; ZENI G. & ROCHA J.B. Organochalcogens affect the glutamatergic neurotransmission in human platelets. Neurochem Res., 29:1505-1509, 2004.

- BORGES V.C.; ROCHA J.B. & NOGUEIRA C.W. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. Toxicology, 215:191-7, 2005
- BRAGA, A.L.; SILVEIRA, C.C.; ZENI, G.; SEVERO, W.A. & STEFANI, H.A. Synthesis of selenocetals from enol ethers. J. Chem. Res., (S) 206-207, 1996.
- BRAGA, A.L.; ZENI, G.; ANDRADE, L.H. & SILVEIRA, C.C. Stereoconservative formation and reactivity of  $\alpha$ -chalcogen-functionalized vinylithium compounds from bromo-vinyl chalcogens. Synlett, 5: 595-596, 1997.
- BRANDT, R. Cytoskeletal mechanism of neuronal degeneration. Cell Tissue Res., 305: 255–265, 2001.
- BRIONES, T.L.; WOODS J.; WADOWSKA, M.; ROGOZINSKA, M. & NGUYEN, M. Astrocytic changes in the hippocampus and functional recovery after cerebral ischemia are facilitated by rehabilitation training. Behav. Brain Res., 171: 17-25, 2006
- CARFAGNA, M.A.; PONSLER, G.D. & MUHOBERAC B.B. Inhibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membrane by simultaneous exposure to metals. Chem. Biol. Interact., 100: 53-65, 1996.
- CARMIGNOTO, G. Reciprocal communication system between astrocytes and neurones. Progress Neurobiol., v.62, pp. 561-581, 2000.
- CARRAWAY, C.A.C. The cytoskeleton in transduction of signal and regulation of cellular function. In: Carraway, K.L. and Carraway, C.A.C. Cytoskeleton: signaling and cellular regulation. New York, Oxford University Press, 2000. p 1-7.
- CASALE, C.H.; EVITALI, G. & BARRA, H.S. Involvement of acetylated tubulin in the regulation of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in cultured astrocytes. FEBS Lett.,534: 115-118, 2003.

- CASALE, C.H.; PREVITALI, G.; SERAFINO, J.J., ARCE, C.A. & BARRA, H.S. Regulation of acetylated tubulin/ $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase interaction by L-glutamate in non-neural cells: involvement of microtubules. Biochim. Biophys. Acta, 1721: 185-192, 2005.
- CHANG, L. & GOLDMAN, R.D. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5, 601-613, 2004.
- CHOU Y.H.; OPAL P.; QUINLAN R.A. & GOLDMAN R.D. The relative roles of specific N- and C-terminal phosphorylation sites in the disassembly of intermediate filament in mitotic BHK-21 cells. J. Cell Sci., 109: 817–826, 1996.
- CHOU, Y.H.; SKALLI, O. & GOLDMAN, R. D. Intermediate filaments and cytoplasmic networking: new connections and more functions. Curr. Opin. Cell Biol., 9: 49-53, 1997.
- CLAYTON, G.D. & CLAYTON, F.E. Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. Wiley, Chichester, 1981.
- COOPER, G.M.O Citoesqueleto e o Movimento Celular. In: Cooper, Geoffrey M. A Célula: uma abordagem molecular. 2.ed.. Porto Alegre: Artmed, 2001. pp. 445-489.
- COTGREAVE, I.A.; MOLDEUS, P.; ENGMAN L. & HALLBERG A. The correlation of the oxidation potentials of structurally related dibenzo[1,4]dichalcogenines to their antioxidance capacity in biological systems undergoing free radical-induced lipid peroxidation. Biochem Pharmacol., 42:1481-5, 1991.
- DE ALMEIDA L.M.; FUNCHAL C.; PELAEZ P.L.; PESSUTTO F.D.; LOUREIRO S.O.; VIVIAN L.; WAJNER M. & PESSOA-PUREUR R. Effect of propionic and methylmalonic acids on the in vitro phosphorylation of intermediate filaments from cerebral cortex of rats during development. Metab Brain Dis., 18:207-19, 2003.
- DUCKETT, S. & WHITE, R. Cerebral lipofuscinosis induced with tellurium: electron dispersive X-ray spectrophotometry analysis. Brain Res., 73:205-214, 1974.



- ELDER, G.A.; FRIEDRICH, V.L.; MARGITA, A. & LAZZARINE, A. Age-related atrophy of motor axons in mice deficient in mid-sized neurofilament subunit. J. Cell Biol., 146: 181-192, 1999.
- ELDER, G.A.; FRIEDRICH, V.L.; BOSCO, P.; KANG, C.; GOUROV, A.; TU, P.H.; LEE, V.M.Y. & LAZZARINI, R.A. Absence of mid-sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L), and neurofilament content. J. Cell Biol., 141:727-739, 1998.
- ELIASSON, C.; SAHLGREN, C.; BERTHOLD, C.H.; STAKELEERG, J.; CELIS, J.E.; BETSHALTZ, C.; ERIKSSON, J.E. & PEKNY, M. Intermediate filament protein partnership in astrocytes. J. Biol. Chem., 274: 23996-24006, 1999.
- ENG, L.F.; GHIRNIKAR, R.S. & LEE, Y.L. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). Neurochem. Res., 25: 1439–1451, 2000.
- ENGMAN, L.; PERSSON, J.; VESSMAN, K.; EKSTROM, M.; BERGLUND, M. & ANDERSSON, CM. Organotellurium compounds as efficient retarders of lipid peroxidation in methanol. Free Radic Biol Med., 19: 441-452, 1995.
- FARINA, M.; FOLMER, V.; BOLVAN, R.C.; ANDRADE, L.H.; ZENI, G.; BRAGA, A.L. & ROCHA, J.B.T. Selenoxides inhibit  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase. Toxicol. Lett., 119, 27-37, 2001.
- FERAILLE, E.; CARRANZA, M.L.; GONIN, S.; BEGUIN, P; PEDEMONTE, C.; ROUSSELOT, M.M.; CAVERZASIO, J.; GEERING, K.; MARTIN, P.V. & FAVRE, H. Insulin-induced stimulation of  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase activity in kidney proximal tubule cells depends on phosphorylation of the alpha-subunit at Tyr-10. Mol. Biol. Cell., 10: 2847-2859, 1999.
- FLOHÉ, L.; GUNZLER, W.A. & SCHOCK, H.H. Glutathione peroxidase-a selenoenzyme. Febs Lett., 32:132–134, 1973.

- FOTIS, H.; TATJANENKO, L.V. & VASILETS, L.A. Phosphorylation of the alpha-subunits of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase from mammalian kidneys and *Xenopus* oocytes by cGMPdependent protein kinase results in stimulation of ATPase activity. J. Biochem., 260: 904-910, 1999.
- FRANZON R.; LAMERS M.L; STEFANELLO F.M; WANNMACHER C.M; WAJNER M. & WYSE A.T. Evidence that oxidative stress is involved in the inhibitory effect of proline on Na(+),K(+)-ATPase activity in synaptic plasma membrane of rat hippocampus. Int J Dev Neurosci., 21: 303-307, 2003
- FUCHS, E. & CLEVELAND, D.W. A structure scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science, 279: 514-519, 1998.
- FUCHS, E. & WEBER, K. Intermediate filaments:structure, dynamics, function and disease. Ann. Rev. Biochem.; 63:345-382, 1994.
- FUNCHAL C.; DE ALMEIDA, L.M.; OLIVEIRA LOUREIRO, S.; VIVIAN, L.; DE LIMA PELAEZ, P.; DALL BELLO PESSUTTO, F.; ROSA, A.M.; WAJNER, M. & PESSOA-PUREUR, R. In vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins from cerebral cortex of rats. Brain Res Prot., 11, 111-118, 2003.
- FUNCHAL C.; DE LIMA PELAEZ P.; OLIVEIRA LOUREIRO S.; VIVIAN L.; DALL BELLO PESSUTTO F.; DE ALMEIDA L.M.V.; TCHERNIN-WOFCHUK S.; WAJNER M & PESSOA-PUREUR R.  $\alpha$ -Ketoisocaproic acid regulates phosphorylation of intermediate filaments in postnatal rat cortical slices through ionotropic glutamatergic receptors. Dev. Brain Res., 139: 267-276, 2002.
- FUNCHAL, C.; QUINCOZES DOS SANTOS, A.; JACQUES-SILVA, M.C.; ZAMONER, A.; GOTTFRIED, C.; WAJNER, M. & PESSOA-PUREUR, R. branched-chain  $\alpha$ -keto acids accumulating in maple syrup urine disease induce reorganization of phosphorylated gfap in c6 glioma cells. Metab. Brain Dis., 20: 205-219, 2005.

- FUNCHAL C.; MORETTO M.B.; VIVIAN L.; ZENI G.; ROCHA J.B. & PESSOA-PUREUR R. Diphenyl ditelluride- and methylmercury-induced hyperphosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit is prevented by organoselenium compounds in cerebral cortex of young rats. Toxicology., 222:143-53, 2006.
- GEISLER, N. & WEBER, K. Self assembly in vitro of 68,000 MW triplet protein into intermediate- sized filaments. J. Mol. Biol., 151: 565-571, 1981.
- GHISLENI, G.; 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 immunocontent. Brain Res., 986: 196–199, 2003.
- GOEDERT, M.; SPILLANTINI, M.G. & DAVIES, S.W. Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. Curr. Opin. Neurobiol., 8: 619-632, 1998.
- GOHARA, R.; TANG, D.; INADA, H.; INAGAKI, M.; TAKASAKI, Y. & ANDO, S. Phosphorylation of vimentin head domain inhibits interaction with the carboxyl-terminal end of alpha-helical rod domain studied by surface plasmon resonance measurements. FEBS Lett., 489: 182-186, 2001.
- GOTOW, T.; TAKEDA, M.; TANAKA, T. & HASHIMOTO, P.H. Macromolecular structure of reassembled neurofilaments are revealed by the quick-freeze deep-etch mice method, differences between NF-M and NF-H subunits in their ability to form cross-bridges. Europ. J. Cell Biol., 58: 331-345, 1992.
- GOTOW, T. & TANAKA, T. Phosphorylation of neurofilament H subunit as related to arrangement of neurofilaments. J. Neurosci. Res., 37: 691-713, 1994.
- GOTOW, T.; TANAKA, T.; NAKAMURA, Y. & TAKEDA, M. Dephosphorylation of largest neurofilament subunit protein influences the structure of crossbridges in reassembled neurofilament. J. Cell Sci., 107: 1946-1957, 1994.

- GOU, J.P.; EYER, J. & LETERRIER, J.F. Progressive hyperphosphorylation of neurofilament heavy subunits with aging: possible involvement in the mechanism of neurofilament accumulation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 215:368-76, 1995.
- GRANT P & PANT H.C. Neurofilament protein synthesis and phosphorylation. J. Neurocytol., 29: 843-872, 2000.
- GUPTA N. & PORTER TD. Garlic and garlic-derived compounds inhibit human squalene monooxygenase. J Nutr., 131:1662-1667, 2001.
- HALLER, W.S. & IRGOLIC, K.J. Diaryl Ditellurides from Grignard-reagents and Elemental Tellurium. J. Organomet. Chem., 38: 97-103, 1972.
- HERRMANN, S. & AEBI, U. Intermediate filaments and their associates: multi-talent structural elements specifying cytoarchitecture and cytodinamics. Curr. Opin. Cell. Biol., 12: 79-90, 2000.
- HESSE, M.; MANGIN, T.M. & WEBER, K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. J. Cell Sci., 114, 2569-2575, 2001.
- HIRANO, A. Cytopathology of amyotrophic lateral sclerosis. In: L.P. Rowland (Eds), Advances in Neurology: Amyotrophic Lateral Sclerosis and other Motor Neuron Diseases vol. 56, Raven Press, New York: 1991, pp. 91–101
- HISANGA, S. & HIROKAWA, N. Structure of peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. J. Mol. Biol., 202: 1997-305, 1988.
- HOFFMAN, P.N.; CLEVELAND, D.W.; GRIFIN, J.W.; LANDES, P.W.; COWAN, N.J. & PRICE, D.L. Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber. Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 84: 3472-3476, 1987.
- HU, L.M. & TAPPEL, A.L. Selenium as a sulphhydryl redox catalyst and survey of potential selenium-dependent enzymes. J. Inorg. Biochem., 30: 99-117, 1987.

- HUNTER, T. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. Cell, 80:225-36, 1995.
- INADA, H.; NAGATA, K.I.; GOTO, H. & INAGAKI, M. Regulation of intermediate filament dynamics: a novel approach using site and phosphorylation state specific antibodies. In: Carraway, K.L., Carraway, C.A.C. Cytoskeleton: signaling and cellular regulation. New York: Oxford University Press: 2000, pp. 183-207.
- INAGAKI, M.; MATSUOKA, Y.; TSUJIMURA, K.; ANDO, S.; TOKUI, T.; TAKAHASHI, T. & INAGAKI, N. Dynamic property of intermediate filaments: regulation by phosphorylation. Bioessays, 18: 481-487, 1996a.
- INAGAKI, M.; NAKAMURA, Y.; TKEDA, M.; NISHUMURA, T. & INAGAKI, N. Glial fibrillary acidic protein: dynamic property and regulation by phosphorylation. Brain Pathology, 4: 239-243, 1994a.
- INAGAKI M.; NISHI Y.; NISHIZAWA K.; MATSUYAMA M. & SATO C. Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. Nature, 328: 649-652, 1987.
- INAGAKI, N.; ITO, M.; NAKANO, T. & INAGAKI, M. Spatiotemporal distribution of protein kinase and phosphatase activities. Trends Biochem. Sci.: 19: 448-452, 1994b.
- INAGAKI, N.; TSUJIMURA K.; TANAKA J.; SEKIMATA M.; KAMEI Y. & INAGAKI, M. Visualization of protein kinase activities in single cells by antibodies against phosphorylated vimentin and GFAP. Neurochem Res., 21: 795-800, 1996b.
- IVASKA, J.; VUORILUOTO, K.; HUOVINEN, T.; IZAWA, I.; INAGAKI, M. & PARKER P.J. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. EMBO J., 24: 3834-3845, 2005.
- IZQUIERDO, I.I. & MEDINA, J.H. Memory formation: the sequence of biochemical events in hippocampus and connection to activity in other brain structures. Neurobiol. Learn Memory, 68: 285-316, 1997.

- JOVANOVIC, J.N.; SIHRA, T.S.; NAIRN, A.C.; HEMMING, Jr H.C.; GREENGAR, P. & CZERNIK, A.J. Opposing changes in phosphorylation of specific sites in synapsin I during Ca<sup>2+</sup>-dependent glutamate release in isolated nerve terminal. J. Neurosci., 21: 7944-7953, 2001.
- JULIEN J.P. Neurofilament functions in health and disease. Curr. Opin. Neurobiol., 9; 554-560, 1999.
- JULIEN, J.P. & MUSHYNSKI W.E. Neurofilaments in health and disease. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 61: 1-23, 1998.
- JUNG, C.; YABE, J.T. & SHEA, T.B. C-terminal phosphorylation of the high molecular weight neurofilament subunit correlates with decrease neurofilament axonal transport velocity. Brain res., 856: 12-19, 2000.
- KANSKI, J.; DRAKE, J.; AKSENOVA, M.; ENGMAN, L. & BUTTERFIELD, D.A. Antioxidant activity of the organotellurium compound 3-[4-(N,N-dimethylamino)benzenetellurenyl]propanesulfonic acid against oxidative stress in synaptosomal membrane systems and neuronal cultures. Brain Res., 911: 12-21, 2001.
- KAPLAN, J.K. Biochemistry of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. Annu. Rev. Biochem., 71:511-535, 2002.
- KARL, J.; GOTTFRIED, C.; TRAMONTINA, F.; DUNKLEY, P.; RODNIGHT, R. & GONÇALVES, C.A. GFAP phosphorylation studied in digitonin-permeabilized astrocytes: standardization of conditions. Brain Res., 853: 32-40, 2000.
- KIRKPATRICK, L.L. & BRADY, S.T. Cytoskeleton of neurons and glia. In Siegel, G.; Agranoff, B.W., Alberts, R.W., Fischer, S.K. & Ulmer, M.D. (eds). Basic Neurochemistry-Molecular, cellular and medical aspects. 6 ed. New York, Lippincott – Raven Publishers, 1999. p. 155-173.
- KNOW, H.J.; WANG, I.K.; AN, H.J.; HAN, S.H.; YANG J.I; SHIN, H.S.; YOO, I.D.; KANG, T.C. & HO WON, M.H. Changes of glial Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase (alpha1 subunit)

- immunoreactivity in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. Brain Res., 987 (2): 233-239, 2003.
- KOLES, L.; WIRKER, K. & ILLES, P. Modulation of ionotropic glutamate receptor channels. Neurochem. Res. 26: 925-932, 2001.
- KRIZ, J.; MEIER, J.; JULIEN, J.P. & PADJEN, A.L. Altered ionic conductances in axons of transgenic mouse expressing the human neurofilament heavy gene: a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Exp. Neurol., 163: 414-421, 2000.
- KU, N.O.; LIAO, J.; CHOU, C.F. & OMARY, M.B. Implications of intermediate filament protein phosphorylation. Cancer Metastasis Rev., 15:429-44, 1996.
- LADEN B.P. & PORTER T.D. Inhibition of human squalene monooxygenase by tellurium compounds: evidence of interaction with vicinal sulfhydryls. J Lipid Res., 42:235-40, 2001.
- LANVIERE, R.C. & JULIEN, J.P. Function of intermediate filaments in neuronal development and disease. J. Neurobiol., 58:131-148, 2004.
- LEE, M.K. & CLEVELAND, D.W. Neuronal intermediate filaments. Ann. Rev. Neurosc., 19: 187-217, 1996.
- LI, B.S.; GRANT, V.P. & PANT, H.C. Calcium influx and membrane depolarization induce phosphorylation of neurofilament (NF-M) KSP repeats in PC12 cells. Mol. Brain Res., 70: 84-91, 1999.
- LOPINA, O.D. Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. Biochemistry (Moscow), 66: 1122-1131, 2001.
- MACIEL E.N.; BOLZAN R.C.; BRAGA A.L. & ROCHA J.B. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride differentially affect delta-aminolevulinate dehydratase from liver, kidney, and brain of mice. J. Biochem. Mol. Toxicol., 14:310-309, 2000.
- McCALL, M.A.; GREGG, R.G.; BEHRINGER, R.R.; BRENNER, M.; DELANEY, C.L.; GALBREATH, E.J.; ZHANG, C.L.; PEARCE, R.A.; CHIU, S.Y. & MESSING, A.

- Target deletion in astrocyte intermediate filament (GFAP) alters neuronal physiology. Proc. National Acad. Sci., 93: 6361-6369, 1996.
- MEIER J.; COUILLARD-DESPRES, S.; JACOMY, H.; GRAVEL, C. & JULIEN, J.P. Extra neurofilament NF-L subunits rescue motor neuron disease caused by overexpression of the human NF-H gene in mice. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 58: 1099-1110, 1999.
- MENET, V.; RIBOTTA, M.G.; CHAUVET, N.; DRIAN, M.J.; LANNOY, J.; COLUCCI-GUYON, E. & PRIVAT, A. Inactivation of glial fibrillary acidic protein gene, but not that of vimentin, improves neuronal survival and neurite growth by modifying adhesion molecule expression. J. Neurosci., 21:6147-6158, 2001.
- MEOTTI, F.C.; BORGES, V.C.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. & NOGUEIRA, C.W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and Ebselen for rats and mice. Toxicol. Lett., 143: 9-16, 2003.
- MEOTTI F.C.; STANGHERLIN E.C.; ZENI G.; NOGUEIRA C.W. & ROCHA J.B. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. Environ Res., 94:276-282, 2004.
- MOORE, E.D.; ETTER, E.F.; PHILIPSON, K.D.; CARRINGTON, W.A.; FOGARTY, K.E.; LIFSHITZ, L.M. & FAY, F.S. Coupling of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump and sarcoplasmic reticulum in smooth muscle. Nature, 365: 657-660, 1993.
- MORETTO M.B.; FUNCHAL C.; ZENI G.; ROCHA J.B. & PESSOA-PUREUR R. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. Toxicology, 210:213-222, 2005b.



- MORETTO, M.B.; FUNCHAL., C.; ZENI, G.; PESSOA-PUREUR R. & ROCHA J.B.T.  
Selenium compounds prevent the effects of methylmercury on the in vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex of young rats. Toxicol Sci., 85: 639-46, 2005a.
- MORETTO, M.B.; ROSSATO, J.L.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. & ROCHA, J.T.B.  
Voltage-dependent selenium and diorganochalcogenides inhibition of Ca-45(2+) influx into brain synaptosomes. J. Biochem. Mol. Toxicol., 17, 154-160, 2003.
- NAIRN, A.C. & SHENOLIKAR, S. The role of protein phosphatases in synaptic transmission, plasticity and neuronal development. Curr. Opin. Neurobiol., 2:296-301, 1992.
- NESTLER, E.J. & GREENGARD, P. Serine and threonine phosphorylation. In: Siegel, G., Agranoff, B.W., Alberts, R.W., Fisher, S.K. & Ulmer, M.D. (eds). Basic Neurochemistry – Molecular, cellular and medical aspect. 6 ed. New York Lippincott –Raven Publishers, 1999. pp. 472-495.
- NIXON, R.A.; PASKEVICH P.A.; SIHANG, R.K. & THAYER, C.Y. Phosphorylation on COOH terminus domains of neurofilament protein in retinal ganglion cell neurons in vivo: influences on regional neurofilament accumulation, interneurofilament spacing and axonal caliber. J. Cell Biol., 126: 1031-1046, 1994.
- NOGUEIRA C.W; BORGES V.C; ZENI G. & ROCHA J.B. Organochalcogens effects on delta-aminolevulinate dehydratase activity from human erythrocytic cells in vitro. Toxicology, 191:169-178, 2003c.
- NOGUEIRA, C.W.; MEOTTI, F.C.; CURTE, E.; PILISSÃO, C.; ZENI, G. & ROCHA, J.B.T. Investigations into potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. Toxicology, 183: 29–37, 2003b.

- NOGUEIRA, C.W.; QUINHONES, E.B.; JUNG, E.A.C.; ZENI, G. & ROCHA, J.B.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. Inflamm. Res., 52: 56–63, 2003a.
- NOGUEIRA, C.W.; ROTTA, L.N.; PERRY, M.L.; SOUZA, D.O. & DA ROCHA, J.B. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. Brain Res., 906:157-163, 2001.
- OMARY, M.B. & KU, N.O. Intermediate filament proteins of the liver: emerging disease association and functions. Hepatology, 25: 1043-1048, 1997.
- OMARY M.B.; KU N.O.; LIAO J. & PRICE D. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. Subcell Biochem., 31:105-140, 1998.
- OMARY M.B.; KU N.O.; TAO G.Z.; TOIVOLA D.M. & LIAO J. "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. Trends Biochem Sci., 31:383-394, 2006.
- PAULMIER, C. Selenoorganic functional groups. In Paulmier, C. (Ed.). Selenium reagents and intermediate in organic synthesis. Pergamon press, Oxford, England, 1986, pp 25-51.
- PARAMIO, J.M. & JORCANO, J.L. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? BioEssay, 24: 836-844, 2002.
- PEKNY,M.; JOHANSSON, C.B.; ELIASSON, C.; STAKEBERG, J.; WALLEN, A.; PERLMANN, T.; LENDAHL, U.; BETSHOLTZ, C.; BERTHOLD, C.H. & FRIESEN, J. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. J. Cell Biol., 145:503-14, 1999.
- PEARSON, R.G.; SOBEL, H. & SONGSTAD, J. Nucleophilic reactivity constants toward methyl iodide and trans-[PT(PY)2CL2]. J. Am. Chem. Soc., 90, 319-326, 1968.
- PETZOLD, A. Neurofilament phosphoforms: Surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. J. Neurol. Sci., 233, 183-198, 2005.

- POLLENZ, R.S. & MCCARTHY, K.D. Analysis of cyclic AMP-dependent changes in intermediate filament protein phosphorylation and cell morphology in cultured astroglia. J. Neurochem., 47: 9-17, 1986.
- PORCIUNCULA L.O.; ROCHA J.B.; BOECK C.R.; VENDITE D. & SOUZA D.O. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. Neurosci Lett., 299:217-220, 2001.
- PURVES, D.; AUGUSTINE, G.J.; FITZPATRICK, D.; KATZ, L.C.; LAMANTIA, A.S.; McNAMARA, J.O. & WILLIAMS, S.M. Transdução intracelular de sinal. In: Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Katz, L.C., LaMantia, A.S. & McNamara, J.O. Neurociências. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. pp 165-185.
- RAJASEKARAN, A.K. & RAJASEKARAN, S.A. Role of Na-K-ATPase in the assembly of tight junctions. A. J. Physiol. Renal Physiol., 285: F388-396, 2003.
- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS CONSTITUINTES DO CITOESQUELETO.  
Disponível em [www.mie.utoronto.ca/labs/lcdlab/biopic](http://www.mie.utoronto.ca/labs/lcdlab/biopic). Acessado em 07.11.2006
- ROTRUCK, J.P.; POPE, A.L.; GANTHER, H.E.; SWANSON, A.B.; HAFEMAN, D.G. & HOESTRA, W.G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. Science, 179, 558-560, 1973.
- RUSSEL, J.B. Química Geral. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1992, v. 2, pp. 1092.
- SANCHES, C.; DÍAZ-NIDO, J. & AVILA, J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of neuronal cytoskeleton function. Prog. Neurobiol., 61: 133-168, 2000.
- SCHWARTZ, K & FOLTZ, C.M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. J. AM. Chem. Soc., 79: 200-214, 1957.

- SCHULMAN, H. Protein phosphorylation in neuronal plasticity and gene expression. Curr. Opin. Neurobiol., 5: 375-381, 1995.
- STANGHERLIN, E.C.; FAVERO, A.M.; WEIS, S.N.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. & NOGUEIRA, C. W. Assessment of reproductive toxicity in male rats following acute and sub-chronic exposures to diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride. Food Chem. Toxicol., 44: 662-669, 2006.
- STANGHERLIN, E.C.; FAVERO, A.M.; ZENI, G.; ROCHA, J.B. & NOGUEIRA C.W. Teratogenic vulnerability of Wistar rats to diphenyl ditelluride. Toxicology, 207:231-9, 2005.
- STEINERT P.M., WANTZ M.L. & IDLER WW. O-phosphoserine content of intermediate filament subunits. Biochemistry, 21: 177-183, 1982.
- STRACK, S.; WESTPHAE, R.S.; CALIBRAN, R.J.; ELENA, F.F. & WADZINSKI, B.E. Protein serine/threonine phosphatase 1 and 2A associated with dephosphorylated neurofilament. Mol. Brain Res., 49: 15-28, 1997.
- STRECK E.L; ZUGNO A.I; TAGLIARI B.; FRANZON R.; WANNMACHER C.M.; WAJNER M. & WYSE A.T. Inhibition of rat brain Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by homocysteine is probably mediated by oxidative stress. Neurochem Res., 26:1195-1200, 2001.
- TAKEMURA, M.; GOMI, H.; COLUCCI-GUYON, E. & ITOHARA, S. Protective role of phosphorylation in turnover of glial fibrillary acidic protein in mice. J. Neurosci., 22: 6972-6979, 2002.
- TAYLOR, A. Biochemistry of tellurium. Biol Trace Elem Res. 55: 231-239, 1996.

- TOIVOLA, D.M.; TAO G.Z.; HABTEZION, A.; LIAO J. & OMARY, M.B. Cellular integrity plus: organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments. Trends Cell Biol., 15:608-617, 2005.
- VASILET, L.A. & SCHWARZ, W. Structure-function relationships of cation binding in the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>ATPase. Biochim. Biophys. Acta., 1154: 201-222, 1993.
- VIOLA, H.; FURMAN, M.; IZQUIERDO, L.A.; ALONSO, M.; BARRO, D.M.; DE SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, I.I. & MEDINA, J.H. Phosphorylated cAMP response element-binding protein as molecular marker of processing in hippocampus: effect of novelty. J. Neurosci., 1, 20 (23) RC 112, 2000.
- XU, Z.; MARSZALEK, J.R.; LEE, M.K.; WONG, P.C.; FOLMER, J.; CRAWFORD, T.O.; HSIEH, S.T.; GRIFFIN, J.W. & CLEVELAND, D.W. Subunit composition of neurofilament species axonal diameter. J. Cell Biol., 133: 1061-1069, 1996.
- WAGNER, O.I; LIFSHITZ, J.; JANMEY, P.A.; LINDEN, M.; MCINTOSH, T.K. & LETERRIER, J.F. Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions. J. Neurosci., 23: 9046-58, 2003.
- WAGNER-RECIO, M.; TOEWS, A.D. & MORELL P. Tellurium blocks cholesterol synthesis by inhibiting squalene metabolism: preferential vulnerability to this metabolic block leads to peripheral nervous system demyelination. J. Neurochem., 57:1891-901, 1991.
- WALBRAN, B.B. & ROBINS, E. Effects of central nervous system accumulation of tellurium on behavior in rats. Pharmacol. Biochem Behav., 9: 297-300, 1978.
- WALLAS, SI. & GREENGARD, P. Protein phosphorylation and neuronal function. Pharmacol. Rev., 43: 299-349, 1991.
- WIDY-TYSZKIEWICZ, E.; PIECHAL, A.; GAJKOWSKA, B. & SMIALEK, M. Tellurium-induced cognitive deficits in rats are related to neuropathological changes in the central nervous system. Toxicol. Lett., 131: 203-214, 2002.

- WORONIECKI, R.; FERDINAND, J.R.; MORROW, J.S. & DEVARAJAN, P. Dissociation of spectrin-ankyrin complex as a basis for loss of Na-K-ATPase polarity after ischemia. Am.J. Physiol. Renal Physiol., 284: F358-364, 2003.
- YU, S.P. Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase: The new face of older player in pathogenesis and apoptotic/ hybrid cell death. Biochem. Pharmacol. 66: 1601-1609, 2003.
- YUDOWSKI, G.A.; EFENDIEV, R.; PEDEMONTE, C.H.; KATZ, A.; BERGGREN, P.J. & BERTORELLO, A. Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase alpha subunit and regulates its trafficking. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 97: 6556-6561, 2000.
- YUFU, K.; ITHO, T.; EDAMATSU, R.; MORI, A. & HIRAKAWA, M. Effect of hyperbaric oxygenation on the Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase and membrane fluidity on cerebro cortical membranes after experimental subarachnoid hemorrhage. Neurochem. Res., 16: 1033-1039, 1993.
- ZENI, G.R.; BARROS, O.S.; DO REGO; MORO, A.V.; BRAGA, A.L. & PEPPE, C. Hydroteluration of Aminoalkynes. Chem. Communications, 11: 1258-1259, 2003.
- ZENI, G.R.; FORMIGA, H. & COMASSETO, J.V. Improved Procedure for the Hydrotelluration of alkynes. Tetrahedron Lett., 41: 1311-1313, 2000.
- ZENI, G.R.; STRACKE, M.P.; NOGUEIRA, C.W.; BRAGA, A.L.; MENEZES, P.H. & STEFANI, H.A. Hydroselenation of Alkynes by Lithium Butylselenolate: An Approach in the Synthesis of Vinylic Selenides. Organic Lett., 6: 1135-1138, 2004.

## 5. ANEXOS

### 5.1. LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Representação esquemática dos constituintes do citoesqueleto.	6
<b>Figura 2:</b> Representação esquemática da estrutura da subunidade de um FI.	7
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática de um neurofilamento.	8
<b>Figura 4:</b> Regulação de proteínas celulares por fosforilação.	10
<b>Figura 5:</b> Estrutura do (PheTe) <sub>2</sub> .	15







# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)