

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

**EFEITO DO SELENOFURANOSÍDEO SOBRE  
MODELOS DE DOENÇA DE ALZHEIMER EM  
CAMUNDONGOS**

**Cristiano Chiapinotto Spiazzi**

**Uruguaiana**

**2017**

**CRISTIANO CHIAPINOTTO SPIAZZI**

**EFEITO DO SELENOFURANOSÍDEO SOBRE MODELOS DE DOENÇA DE  
ALZHEIMER EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francielli Weber Santos Cibirin

**Uruguaiana**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos  
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do  
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

S754e Spiazzi, Cristiano Chiapinotto  
EFEITO DO SELENOFURANOSÍDEO SOBRE MODELOS DE DOENÇA DE  
ALZHEIMER EM CAMUNDONGOS / Cristiano Chiapinotto Spiazzi.  
93 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Pampa, DOUTORADO  
EM BIOQUÍMICA, 2017.  
"Orientação: Francielli Weber Santos Cibirin".

1. Doença de Alzheimer. 2. selenofuranosídeo. 3.  
organoselênio. 4. estresse oxidativo. 5. neuroinflamação. I.  
Título.

**CRISTIANO CHIAPINOTTO SPIAZZI**

**EFEITO DO SELENOFURANOSÍDEO SOBRE MODELOS DE DOENÇA DE  
ALZHEIMER EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica.

Área de concentração: Bioprospecção Molecular

Tese defendida e aprovada em 11 de março de 2017.

Banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francielli Weber Santos Cibir  
Orientadora  
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Rosa Chitolina Schetinger  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Luchese  
Universidade Federal de Pelotas (UFPEl)

---

Prof. Dr. Robson Luiz Puntel  
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

---

Dr<sup>a</sup>. Mauren Assis de Souza  
Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA)

Dedico esta tese à minha família que sempre esteve ao meu lado para o que eu precisasse e nunca me deixaram desistir. Aos meus amigos e colegas de laboratório que sempre me ajudaram, e a minha orientadora, que sempre acreditou em mim.

## **AGRADECIMENTO**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Carlos e Evani, e também minha irmã Sendi, por todo apoio e incentivo que eles me deram durante esse tempo, mesmo estando longe. Obrigado pela educação, carinho e pelo suporte, sem isso eu nunca teria conseguido me tornar o que sou hoje.

Um agradecimento especial à minha orientadora, Francielli, por ser essa pessoa incrível, e por ter tido paciência comigo e ter me acolhido no laboratório, o qual acabou se tornando uma segunda família. Mesmo quando eu não tinha certeza do que eu estava fazendo, ela nunca me deixou desacreditar do trabalho e sempre viu o lado bom dos resultados, mesmo quando encontrávamos o inesperado. Fico grato pela oportunidade de ter trabalhado contigo e por todo conhecimento que foi passado. Isso fez com que toda a vivência da pós-graduação se tornasse muito mais proveitosa.

Agradeço aos meus amigos e colegas de laboratório (mesmo os que não estão mais efetivamente no laboratório), por fazerem parte dessa caminhada e por serem minha segunda família em Uruguaiana. Em especial à Melina, por ter literalmente ajudado a finalizar essa tese, entre inúmeras ajudas e favores.

Também sou grato ao Prof. Rudi por ter me aceitado no laboratório dele, e por possibilitar o desenvolvimento do meu projeto, bem como a CAPES, por fornecer essa oportunidade.

**MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

A população mundial está envelhecendo e doenças neurodegenerativas, tais como a Doença de Alzheimer (DA), estão se tornando cada vez mais comuns. Novas formas de retardar o progresso da doença vem sendo estudadas, como a utilização de substâncias com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, tais como compostos de selênio. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do selenofuranosídeo, um composto orgânico de selênio sintético, em dois modelos animais de demência esporádica tipo-Alzheimer. **Primeiro experimento:** Uma única administração do peptídeo A $\beta$  (fragmento 25-35; 3 nmol/3  $\mu$ L) ou água destilada foi injetada via intracerebroventricular (i.c.v.) em camundongos machos. O selenofuranosídeo (5 mg/kg SE) ou veículo (óleo de canola, VEH) foi administrado por via oral 30 min antes da A $\beta$  e durante os 7 dias subsequentes. A memória foi testada por meio do labirinto aquático de Morris (MWM) e esquivas passivas de descida (SDPA). O estresse oxidativo foi analisado através das atividades das enzimas SOD, CAT, GPx, GR e GST, bem como os níveis de espécies reativas (RS) e GSH. Os níveis de citocinas inflamatórias foram avaliados para medir o processo inflamatório, e a atividade da AChE para estimar o dano sináptico. No grupo A $\beta$  houve redução significativa da atividade da SOD e aumento da atividade da AChE, níveis de RS, de IL-6 e GSH. Observou-se uma redução na latência de descida no SDPA, e aumento na latência para encontrar a plataforma no MWM. O SE foi capaz de proteger contra perda de memória em camundongos, provavelmente através da modulação da atividade da AChE. O composto foi capaz de proteger contra a redução da atividade da SOD, reduzindo os níveis de RS. E apesar do grupo SE mostrar aumento nos níveis de IL-6, o grupo A $\beta$ +SE apresentou níveis iguais aos do controle. **Segundo experimento:** camundongos C57BL/6J de ambos sexos do tipo selvagem (WT) e transgênicos para os genes APP/PS1 (TG) foram utilizados. O SE (10 mg/kg) ou VEH foram administrados oralmente, duas vezes por semana, durante 5 meses. Testes comportamentais incluindo MWM, labirinto em Y, labirinto em cruz elevada (EPM), e o teste de preferência social/novidade social (SPSN), foram realizados para avaliar a memória e comportamento tipo ansiedade. Ambos genótipos tiveram performance semelhante no labirinto em Y, EPM e SPSN. Na fase de aquisição do MWM, foi visto efeito do genótipo nos dias 7, 9 e 10, onde animais TG apresentaram aumento da

distância percorrida e latência para encontrar a plataforma. Animais WT passaram mais tempo no quadrante alvo do MWM durante segundo teste sem plataforma. Secções coronais cerebrais foram avaliadas para GFAP, A $\beta$  e depósitos de placas amiloides através de imuno-histoquímica. SE foi capaz de reduzir significativamente a produção de GFAP e depósitos de A $\beta$  em camundongos TG, mas isso não foi observado nos testes comportamentais. No entanto, o fato do selenofuranosídeo ser capaz de reduzir depósitos de A $\beta$  em camundongos APP/PS1 e proteger contra várias alterações observadas com a administração do fragmento A $\beta$  é promissor para estudos futuros.

Palavras-chave: Doença de Alzheimer; selenofuranosídeo; organoselênio; camundongos transgênicos; estresse oxidativo; neuroinflamação

## ABSTRACT

World population is increasingly older and neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD), are becoming more common. New ways to retard AD progress are being studied, such as substances with antioxidant and anti-inflammatory properties, like organoselenium compounds. The aim of this study was to evaluate the effect of selenofuranoside, a synthetic organoselenium compound, in two Alzheimer-like sporadic dementia animal model. **First experiment** – Single administration of A $\beta$  peptide (fragment 25–35; 3 nmol/3  $\mu$ L) or distilled water were administered via intracerebroventricular (i.c.v.) in male mice. Selenofuranoside (5 mg/kg, SE) or vehicle (canola oil, VEH) was administered via oral 30 min before A $\beta$  and for 7 subsequent days. Memory was tested through Morris water maze (MWM) and step-down passive avoidance (SDPA) tests. Oxidative stress balance was assessed via SOD, CAT, GPx, GR and GST activities along with reactive species (RS) and GSH levels. Inflammatory cytokines levels were measured to assess inflammation progress, and AChE activity to estimate synaptic status. A $\beta$  group presented a significant decrease in SOD activity and an increase in AChE activity, RS levels, IL-6 and GSH. A reduction in step-down latency in SDPA, and also latency to reach the platform former location in MWM was observed. SE was able to protect against memory loss in mice, probably due to AChE activity modulation. The compound was also able to protect against SOD activity reduction, reducing RS levels. Although an increase in IL-6 was observed in SE group, A $\beta$ +SE showed the same levels of control group. **Second experiment** – male and female wild-type (WT) mice (C57BL/6J) and APP/PS1 transgenic (TG) mice were used. SE (10 mg/kg, SE) or VEH were administered via oral twice a week, for 5 month-period. Behavioural tests including Morris water maze (MWM), Y-Maze, elevated plus-maze (EPM), Social Preference/Social Novelty test (SPSN), were performed to assess memory and anxiety-like behavior. Both genotypes performed alike at Y-maze, EPM and SPSN tests. At MWM acquisition phase, a main-effect of genotype was observed at days 7, 9 and 10, where TG mice presented an increase in path length and latency to find the platform. Also, WT mice spent more time in the target quadrant during the second probe of MWM. Immunohistochemical analysis was done in coronal brain sections to evaluate A $\beta$  deposits, GFAP production and amyloid plaques. SE treatment significantly decreased GFAP production and A $\beta$ <sub>1-16</sub> deposits at TG mice, but this was

not reflected at the behavioral tests. Nonetheless, the fact that selenofuranoside was able to reduce A $\beta$ 1-16 deposits in APP/PS1 mice and protected against various alterations exhibited by A $\beta$  fragment is promising for further studies.

Key-words: Alzheimer's Disease; selenofuranoside; organoselenium; transgenic mice; oxidative stress; neuroinflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

Figura 1 – Representação do cérebro com DA, placas amiloides e emaranhado neurofibrilar	18
Figura 2 – Incidência da DA conforme a idade em diferentes países	19
Figura 3 – Representação das vias amiloidogênica e não-amiloidogênica	24
Figura 4 – Representação gráfica dos microtúbulos desestabilizados pela saída da proteína tau, e formação dos emaranhados neurofibrilares	25
Tabela 1 – Exemplos de quantidades de Se contidas em alguns alimentos de origem animal e vegetal	34
Tabela 2 – Dose recomendada e limite máximo tolerado de Se de acordo com a idade (a partir de 1 ano)	35
Figura 5 – Estruturas químicas da selenometionina e metilselenocisteína	36
Tabela 3 – Selenoproteínas de mamíferos, suas abreviaturas, tecidos e compartimentos celulares encontradas e principais funções/ações desempenhadas	36
Figura 6 – Estruturas químicas simplificadas de compostos orgânicos de selênio	40
Figura 7 – Estrutura química do selenofuranosídeo	41

### **ARTIGO 1 - Selenofuranoside Ameliorates Memory Loss in Alzheimer-Like Sporadic Dementia: AChE Activity, Oxidative Stress, and Inflammation Involvement**

Figure 1. Selenofuranoside structure.	46
Figure 2. Experimental procedure.	46
Table 1. Effect of selenofuranoside on antioxidant enzymes glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, catalase, and superoxide dismutase in mice exposed to A $\beta$ (25–35) peptide.	48

Figure 3. Effect of selenofuranoside on the latency (s) to reach the platform in the acquisition phase in mice with amyloid- $\beta$ induced memory deficit in Morris water maze test ( $n = 10$ ).	48
Figure 4. Effect of selenofuranoside on amyloid- $\beta$ induced memory deficit in Morris water maze test ( $n = 10$ ). (a) Latency (s) to reach the platform in the probe test (retention phase). (b) Time (s) spent in the former platform quadrant in the probe test. (c) Number of crossings over the former platform position, in the probe test.	49
Figure 5. Effect of selenofuranoside on the step-down latency (s) in mice with amyloid- $\beta$ induced memory deficit on the passive avoidance test ( $n = 10$ )	49
Figure 6. Effect of selenofuranoside in mice with memory deficit induced by amyloid- $\beta$ on the open-field test ( $n = 10$ ). (a) Number of crossings and (b) number of rearings.	50
Figure 7. Effect of selenofuranoside on glutathione levels in mice brain after amyloid- $\beta$ treatment ( $n = 10$ ).	50
Figure 8. Effect of selenofuranoside on reactive species levels in mice brain after amyloid- $\beta$ treatment ( $n = 10$ ).	50
Figure 9. Effect of selenofuranoside on acetylcholinesterase activity in mice brain after amyloid- $\beta$ treatment ( $n = 10$ ).	50
Figure 10. Effect of selenofuranoside on cytokines levels in mice brain after amyloid- $\beta$ treatment ( $n = 3$ ).	51

## **ARTIGO 2 - Selenofuranoside reduces A $\beta$ (1-16) deposition and GFAP production but does not improve memory impairment in APP/PS1 transgenic mice**

Figure 1. Time, in seconds, spent at the rod during Rotarod test of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE).	60
Figure 2. Number of sensor beam crossings during 23 hours cage activity test of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE)	60

- Figure 3. (A) Total number of arm entries during 10 minutes and (B) Percentage of spontaneous arm alternations during 10 minutes at Y-Maze test of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). 61
- Figure 4. (A) Percentage of time ratio spent at S1 side during social preference divided in 2 min intervals and (B) Percentage of time ratio spent at S2 side during social novelty divided in 2 min intervals at SPSN test of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). 62
- Figure 5. (A) Escape latency and (B) Path Length to reach the platform during acquisition phase at Morris Water Maze of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). 64
- Figure 6. Time, in seconds, spent in each pool quadrant during probe phase at Morris Water Maze of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). TQ = Target quadrant; Opp = Opposite quadrant; Adj1 = Adjacent quadrant 1; Adj2 = Adjacent quadrant 2. 65
- Figure 7. Escape latency to reach the platform during probe tests at Morris Water Maze of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). 66
- Figure 8. Number of crossing at the absent platform location during probe tests at Morris Water Maze of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). 66
- Figure 9. (A) Total number of beam crosses, (B) Percentage of open arm entries and (C) Time spent on open arms during 10 min at the Elevated Plus Maze (EPM) of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). 67
- Figure 10. Coronal brain slices stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Thioflavin-S, primary monoclonal mouse anti-A $\beta$  (1-16) antibodies (6E10) and primary polyclonal rabbit anti-GFAP antibodies (GFAP) of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). 68
- Figure 11. Percentage of total high magnification area of coronal brain slices stained by primary monoclonal mouse anti-A $\beta$  (1-16) antibodies (6E10), primary polyclonal rabbit anti-GFAP antibodies (GFAP) and Thioflavin-S of APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). 69

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\delta$ -ALA-D:  $\delta$ - aminolevulinato desidratase  
 $\beta$ -a: Beta amiloide  
 $\beta$ a 1-42: beta amiloide 42 aminoácido  
Ach: Acetilcolina  
AChE: Acetilcolinesterase  
AChT: Acetil transferase  
ADAM:  $\alpha$  desintegrin- and metalloprotease- family enzyme  
ALA: ácido  $\alpha$  lipoico  
APH: Anterior pharynx-defective  
APP: Amyloid precursor protein – Proteína Precursora Amiloide  
ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry  
BACE 1:  $\beta$ - site APP cleaving enzyme  
CAT: Catalase  
Cdk: Quinase dependente de Ciclina  
CK: Caseína quinase  
COX: Ciclo-oxigenase  
DA: Doença de Alzheimer  
DAF-16/FOXO:  
DFO: desferroxiamina  
EOAD: Early Onset Alzheimer's Disease  
EROs: Espécies Reativas de Oxigênio  
EUA: Estados Unidos da América  
FDA: Food and Drug Administration  
Fe: Ferro  
GFAP: Proteína Acídica Fibrilar Glial  
GPx: Glutathione Peroxidase  
GSK3 $\beta$ : Glicogênio Sintase Quinase 3 beta  
IL-1 $\beta$ : Interleucina 1  $\beta$   
IL-6: Interleucina 6  
LOAD: Late Onset Alzheimer's Disease  
MAP: Microtubule- associated protein  
mAChR: Receptor Muscarínico de Acetilcolina  
MsrB: Metionina sulfóxido redutase  
nAChR: Receptor Nicotínico de Acetilcolina  
NADPH: Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida  
NDB No: Nutriente Database Number  
OH: Radical hidroxila  
PEN 2: Presenilin enhancer  
PIXE: Particle- Induced X-ray Emission  
PS: presenilina  
PS1: presenilina 1  
PS2: presenilina 2  
RDA: Recommend Dietary Allowance  
Se: Selênio  
Ser: Serina  
SOD: Superóxido Dismutase  
SNC: Sistema Nervoso Central  
SPS: Selenofosfatase sintetase

TBARS: Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico  
Thr: Treonina  
TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  
TR: Tioredoxina  
UL: Tolerable upper intake level  
USDA: United States Department of Agriculture

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO .....	18
2.1. DOENÇA DE ALZHEIMER .....	18
2.1.1. Histórico e impacto social .....	18
2.1.2. Características da doença .....	21
2.1.3. Fatores patogênicos .....	22
2.1.3.1. Hipótese do amiloide .....	23
2.1.3.2. Hipótese da tau .....	25
2.1.3.3. Déficit colinérgico .....	26
2.1.3.4. Neuroinflamação .....	27
2.1.3.5. Estresse oxidativo .....	28
2.1.4. Modelos animais para estudo da DA .....	29
2.1.5. Tratamentos para Doença de Alzheimer .....	31
2.2. SELÊNIO .....	33
2.2.1. Histórico, abundância e importância .....	33
2.2.2. Selênio no organismo .....	35
2.2.3. Compostos orgânicos de selênio e neuroproteção .....	39
3. OBJETIVO .....	42
3.1. Objetivo Geral .....	42
3.2. Objetivos específicos .....	42
4. ARTIGOS CIENTÍFICOS .....	43
5. DISCUSSÃO .....	73
6. CONCLUSÃO .....	77
7. REFERENCIAS .....	78
ANEXO I – Certificado de aprovação de Protocolo para uso de animais em pesquisa .....	93

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer (DA) foi descoberta há mais de um século pelo médico alemão Alois Alzheimer, enquanto ele estudava um caso clínico de uma paciente de 51 anos que estava internada no Hospital de Frankfurt e apresentava perda de memória progressiva, alucinações e delírios. Após a morte da paciente, o médico fez um análise cerebral identificando as principais características neuropatológicas da doença, como a presença de depósitos extra e intracelulares (que viriam a ser identificados mais tarde), e também a perda neuronal (Goedert and Spillantini 2006, Souchay 2007).

A DA é um processo patológico neurodegenerativo relacionado principalmente ao envelhecimento, representando cerca de 2/3 dos casos de demência (Blennow, Leon et al. 2006). Entre os sintomas apresentados estão: afasia (desordem de linguagem com dificuldade de identificação, fluência, compreensão e associação das palavras), apraxia (perda da capacidade de executar movimentos) e agnosia (deterioração na capacidade de reconhecer ou identificar objetos e/ou familiares) (Helmes and Ostbye 2002).

Essa doença vem sendo estudada há muito tempo com o intuito de entender os mecanismos moleculares pelos quais ela é originada. A descoberta da constituição das placas senis, também chamadas de placas neuríticas, ocorreu somente nos anos 80, evidenciando que essas placas eram formadas por agregados do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ a). Esse peptídeo é gerado a partir da clivagem sequencial da Proteína Precursora Amiloide (PPA), através da ação de complexos enzimáticos chamados  $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretases (Laferla, Green et al. 2007). Esse processo acaba gerando fragmentos amiloides de 38 a 43 aminoácidos (Mattson 2004, Selkoe 2004), aonde o fragmento mais abundante é o de 40 aminoácidos ( $\beta$ a 1-40), entretanto ele não está associado à formação das placas. O fragmento que apresenta maior propensão à formação de fibrila é o  $\beta$ a que apresenta 42 aminoácidos ( $\beta$ a 1-42), representando cerca de 10% dos fragmentos produzidos na clivagem da PPA (Selkoe 2001, Laferla, Green et al. 2007). O aumento nos níveis desses peptídeos leva a alterações na ação de enzimas quinases e fosfatases, e conseqüentemente acarreta a hiperfosforilação da proteína *tau* ( $\tau$ ), que, assim como a  $\beta$ a, também está envolvida na formação dos emaranhados neurofibrilares.

Além disso, a DA também está envolvida com a resposta inflamatória. Tecidos degenerados e materiais anormais altamente insolúveis são estimulantes clássicos da inflamação, dessa forma depósitos de  $\beta$ a e emaranhados neurofibrilares acabam estimulando a micróglia, ocorrendo a liberação de mediadores inflamatórios e fatores neurotóxicos (Akiyama, Barger et al. 2000). Esse processo neurodegenerativo ocorre num ciclo que se mantém ativo, iniciado pela secreção das citocinas como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6 na resposta amiloidogênica, onde a ativação da micróglia e astrócitos aumenta a geração dessas citocinas, provocando um aumento no depósito de  $\beta$ a, que por sua vez ativará novas células gliais, perpetuando assim esse ciclo vicioso (Heneka and O'Banion 2007).

Além disso, acredita-se também que o estresse oxidativo esteja envolvido na patologia da doença (Cai and Yan 2007), dessa forma, a utilização de compostos antioxidantes e anti-inflamatórios seria uma forma de prevenir ou tratar essa doença.

Alguns compostos orgânicos de selênio já demonstraram ter a capacidade de mimetizar compostos naturais apresentando propriedades biológicas importantes, e.g., propriedade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral (Shamberger 1983, Nicolau and Petasis 1984). Wollenhaupt et al. (2014) demonstrou que compostos de selênio e telurofuranosídeos protegeram contra a toxicidade induzida por manganês em nematódeos *Caenorhabditis elegans*, levando a translocação nuclear do fator de transcrição DAF-16/FOXO, regulando a resposta ao estresse, envelhecimento e metabolismo (Wollenhaupt, Soares et al. 2014).

Dessa forma, esse estudo tem como objetivo estudar os efeitos de um composto orgânico sintético de selênio, o selênio-furanosídeo, sobre as alterações comportamentais e bioquímicas desenvolvidas em diferentes modelos de Doença de Alzheimer.

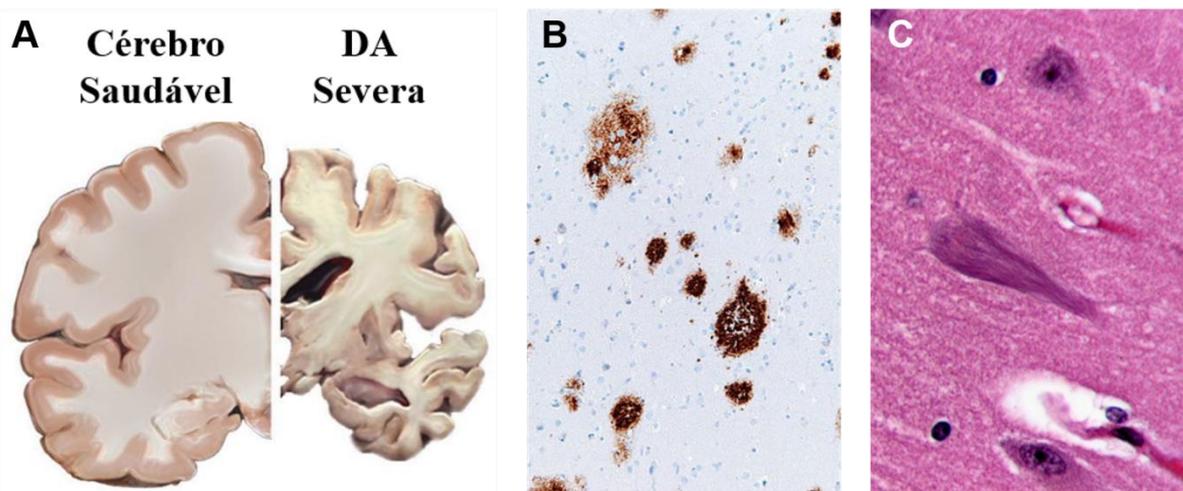
## 2. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 2.1. DOENÇA DE ALZHEIMER

#### 2.1.1. Histórico e impacto social

A Doença de Alzheimer (DA) foi descoberta há mais de um século pelo médico alemão Alois Alzheimer, enquanto ele estudava um caso clínico de uma paciente de 51 anos conhecida somente como Auguste D. A paciente foi internada no Hospital Psiquiátrico de Frankfurt após o seu marido relatar sinais de paranoia, perda de memória progressiva, alucinações, distúrbios de sono e agressividade. Alois Alzheimer se interessou pela sintomatologia da doença e documentou o seu desenvolvimento desde a admissão de Auguste. Depois da morte da paciente, cerca de 5 anos após sua admissão no hospital, Alzheimer foi capaz de analisar as características morfológicas e histológicas no cérebro de Auguste. Ele identificou o encolhimento de certas regiões cerebrais, bem como a presença de placas senis e de emaranhados neurofibrilares, que hoje são consideradas as principais características neuropatológicas da doença (Goedert and Spillantini 2006, Souchay 2007) (Figura 1).

Figura 1 – Representação do cérebro com DA (A), placas amiloides (B) e emaranhado neurofibrilar (C)



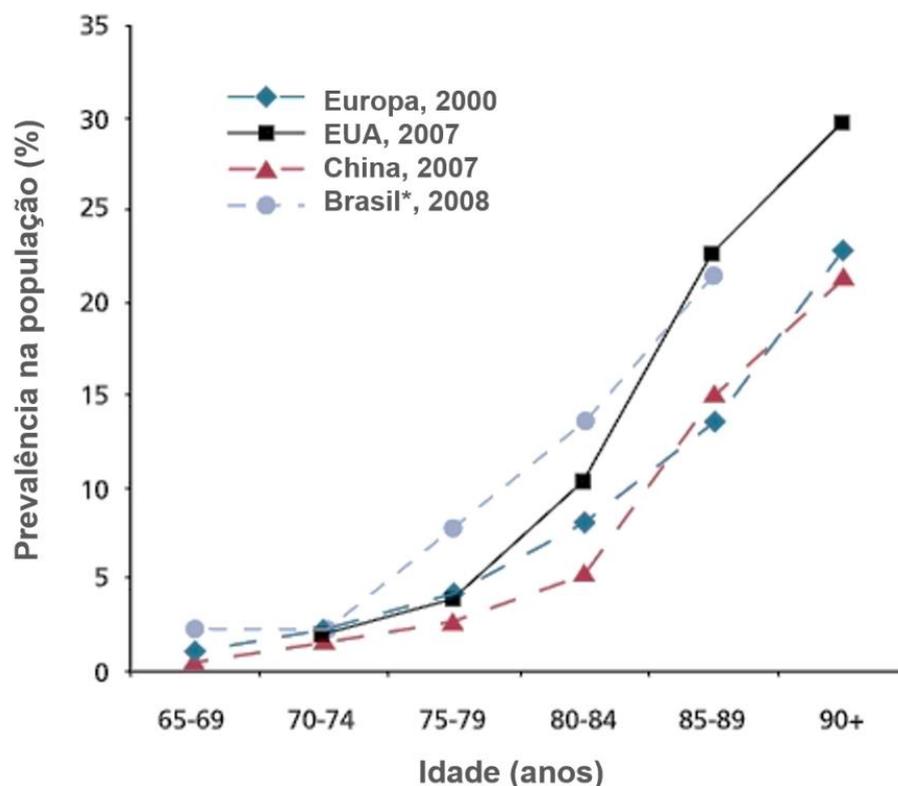
Fonte: Google imagens, direitos de uso marcados para reutilização não comercial com modificações

Acredita-se, atualmente, que exista cerca de 46,8 milhões de pessoas que possuem alguma forma de demência no mundo (Prince, Wimo et al. 2015). Pesquisas

mostram que esse número deve dobrar a cada 20 anos (Prince, Bryce et al. 2013), podendo chegar a 74,7 milhões em 2030 e 131,5 milhões em 2050. Dentre todos os tipos de demência, a DA é a que mais prevalece, representando cerca de 70 a 80% dos casos (Blennow, Leon et al. 2006, Qiu, Kivipelto et al. 2009, Prince, Wimo et al. 2015).

A DA está relacionada principalmente ao envelhecimento, visto que a maior parte dos casos ocorre em indivíduos com mais de 65 anos de idade. A incidência da doença aumenta de forma progressiva com a idade, apresentando uma incidência predominante em indivíduos com mais de 85 anos (Xu, Ferrari et al. 2013) (Figura 2). Nos Estados Unidos, por exemplo, aproximadamente um a cada dez idosos com mais de 65 anos apresenta algum tipo de demência, ao mesmo tempo que mais de um terço das pessoas com mais de 85 anos apresentam sintomas e sinais relacionados a DA. Esse é um dos motivos para o aumento previsto para o número de casos de demência no mundo, visto que a expectativa de vida está cada vez maior. Só nos EUA, a expectativa aumentou de 49 para 76 anos durante o século XX (Selkoe 2001).

Figura 2 – Incidência da DA conforme a idade em diferentes países



Fonte: Adaptado de Qiu, Kivipelto et al. (2009)

A maior parte dos casos registrados se encontram em países classificados como de baixa e média renda, apresentando cerca de 58% dos casos de demência. Essa parcela deve aumentar ainda mais nos próximos anos, em parte porque o número de idosos que vivem nesses países irá aumentar em uma proporção muito maior quando comparado com países desenvolvidos. Por exemplo, estima-se que até 2050 o número de idosos em países de alta renda aumente em 56%, comparado com 138% em países de média renda e 185% em países de baixa renda (Prince, Wimo et al. 2015).

Um informativo divulgado pela *Alzheimer's Association* em 2015 apontou que a DA é a quinta causa de morte mais comum em indivíduos com mais de 65 anos nos Estados Unidos. Entretanto, muitas vezes o obituário de indivíduos com DA indica outras enfermidades como causa primária de morte (e.g. pneumonia), sendo que a presença de comorbidades é comum nesses pacientes devido seu estado de debilidade (Prince, Wimo et al. 2015)

Em países desenvolvidos, o número de mortes devido a DA está crescendo, em contraste com outros tipos de doença. Nos EUA, por exemplo, o número de mortes relacionadas a DA cresceu 71% entre 2000 e 2013, enquanto que, nesse mesmo período, mortes relacionadas a doenças cardíacas – causa líder de mortes nos EUA – diminuiu 14% (Alzheimer's Association 2016). No Brasil, há cerca de 1,2 bilhões de casos de demência, sendo que a prevalência entre idosos entre 60 e 65 anos é de 7%, e mais da metade desses casos apresentam a DA (Perroni 2007, Associação Brasileira de Alzheimer 2017).

Um estudo da *Alzheimer's Disease International*, agência internacional que luta contra a DA e outras demências, indica que o custo anual total com pacientes que sofrem com a DA seja de aproximadamente US\$ 817,9 bilhões, sendo que quase 90% desse gasto ocorre em países de alta renda. Esse valor leva em consideração os custos médicos diretos, o trabalho de cuidados social e os cuidados informais. Para fins de comparação, esse valor é superior aos valores de mercado da Apple (US\$ 742 bilhões) e da Google (US\$ 368 bilhões). O mesmo estudo sugere que esse gasto será de US\$ 1 trilhão em 2018, e pode chegar a US\$ 2 trilhões até 2030 (Prince, Wimo et al. 2015).

Em média, cerca de 40% do gasto com DA está relacionado aos cuidados informais, isto é, trabalho não-remunerado geralmente realizado por familiares do paciente. Esse custo é estimado levando em conta o salário médio de um cuidador

profissional. A proporção gasta com cuidados informais é maior em países de baixa renda, onde pode chegar até 70% do gasto total com DA, e relativamente menor em países de alta renda, onde se gasta mais com cuidados sociais diretamente fornecidos por profissionais ou lares de auxílio especializados.

A busca por auxílio médico é relativamente baixa e pouco usual, especialmente em países de baixa e média renda, onde a demência é muitas vezes vista como parte normal do envelhecimento. A demanda por cuidados médicos tende a aumentar no futuro devido à melhora na conscientização e também, possivelmente, melhores tratamentos.

### **2.1.2. Características da doença**

Há três formas em que a DA pode se manifestar. Elas são classificadas como esporádica, também chamada de Doença de Alzheimer de incidência tardia (do inglês, *Late Onset Alzheimer's Disease*, LOAD), a Doença de Alzheimer de incidência precoce (do inglês, *Early Onset Alzheimer's Disease*, EOAD) e a forma familiar. A DA é chamada de esporádica quando não há indícios explícitos sobre a patogênese, podendo a mesma ser desencadeada por diversos fatores. Essa forma é a mais prevalente, representando mais de 90% dos casos. O seu início geralmente é verificado em indivíduos com idade entre 60 e 70 anos (Crews and Masliah 2010).

A forma de DA familiar está relacionada com a presença de mutações nos genes Proteína Precursora Amilóide (do inglês, *Amyloid Precursor Protein – APP*), presenilina 1 (*PS1*) e presenilina 2 (*PS2*), e tem início mais precoce quando comparado com a LOAD, sendo observada em indivíduos que apresentam cerca de 40 e 50 anos. Como o nome sugere, essa forma da doença pode ser passada por herança genética de pais para filhos. Esta é extremamente rara e apresenta a menor incidência, cerca de 1%.

As mutações genéticas nesses genes também estão associadas a EOAD, que ocorre em indivíduos com idade pouco avançada, podendo ser observada até mesmo em pessoas com idade inferior a 40 anos, e tem incidência de cerca de 5%. Pesquisas também mostram que defeitos no cromossomo 14 também podem estar envolvidos (Van Broeckhoven, Haan et al. 1990). Pessoas com Síndrome de Down tem um risco maior de desenvolver essa forma de doença.

Apesar da diferença na patogênese entre essas formas da doença, os sintomas apresentados são similares, como:

- a. Afasia – desordem de linguagem com dificuldade de identificação, fluência, compreensão e associação das palavras;
- b. Apraxia – perda da capacidade de executar movimentos e gestos precisos, apesar da intenção do paciente;
- c. Agnosia – deterioração na capacidade de reconhecer ou identificar objetos e/ou familiares (Helmes and Ostbye 2002).

A doença pode ocorrer em vários estágios de desenvolvimento. Algumas fontes classificam os sintomas em sete estágios, porém o diagnóstico para DA mais reconhecido é dividido em três fases: leve, moderada e severa (Alzheimer's Association 2017).

A DA leve está associada com confusão, problemas em lembrar da palavra correta, dificuldade em lembrar nomes de pessoas recém introduzidas, variações de humor, perda de objetos, dificuldade de planejamento e organização.

A forma moderada da doença está relacionada com o esquecimento de eventos que ocorrem no passado, incapacidade de lembrar o próprio endereço ou telefone, confusão sobre onde está ou que dia é, necessidade de ajuda para escolher roupas, incontinência urinária, mudança no padrão de sono, risco de se perder ou vagar sozinho, mudança de personalidade e comportamentos.

Já no estágio severo, os pacientes apresentam problema de deglutição, dificuldade de locomoção, perda de apetite e de peso, susceptibilidade a infecções (especialmente pneumonia), perda completa da memória de curto e longo prazo. Nesse estágio, o paciente requer atenção em tempo integral.

### **2.1.3. Fatores patogênicos**

Durante décadas após a descrição dos sintomas da doença descoberta por Alois Alzheimer, pouco progresso foi realizado sobre a patogênese dessa doença. Somente com o advento da microscopia eletrônica, na década de 1960, Michael Kidd e Robert Terry foram capazes de descrever as lesões neurais ultra estruturais que caracterizam a doença: placas neuríticas e emaranhados neurofibrilares (Selkoe 2001).

Mais de uma teoria foi proposta para a patogênese da DA, como a hipótese amiloide e da proteína *tau*, porém existem outros fatores que contribuem para o desenvolvimento dessa doença.

#### 2.1.3.1. Hipótese do amiloide

Essa doença vem sendo estudada há muito tempo com o intuito de entender os mecanismos moleculares pelos quais ela é originada. A descoberta da constituição das placas senis, também chamadas de placas neuríticas, ocorreu somente nos anos 80, evidenciando que essas placas eram formadas por agregados do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $\beta$ a).

Para entender a formação desses agregados, é necessário falar primeiramente sobre a proteína precursora amiloide (APP). Ela é uma proteína integral de membrana que pode sofrer clivagem através da ação de três complexos enzimáticos (Laferla, Green et al. 2007):

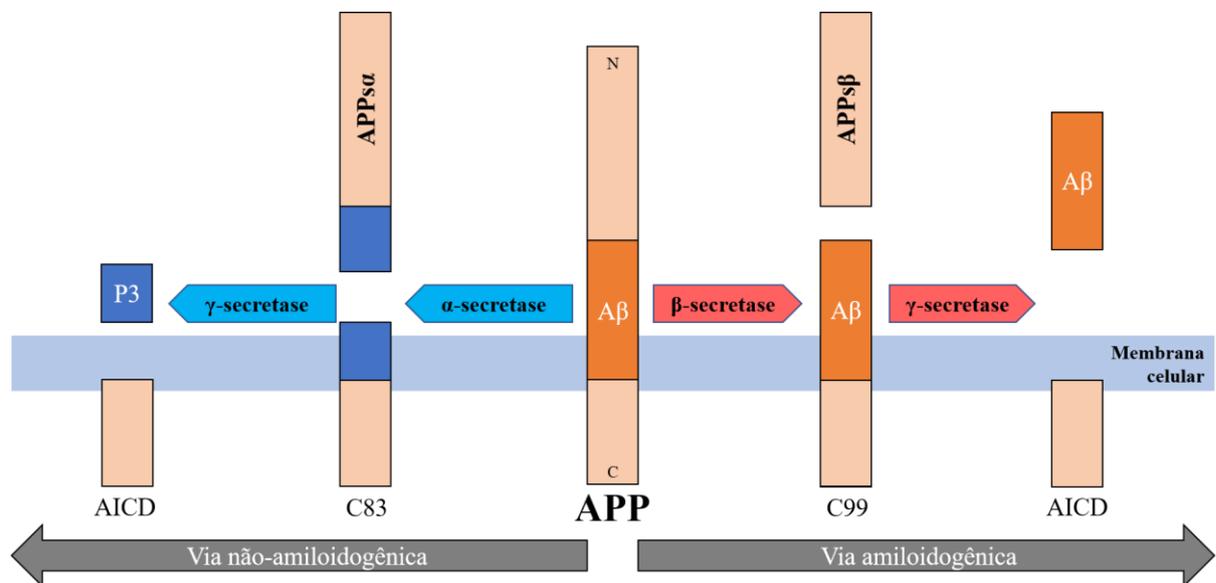
- a.  $\alpha$ -secretase, pertencente à família de enzimas desintegrina e metaloproteína (do inglês, *a desintegrin- and metalloprotease-family enzyme*, ADAM).
- b.  $\beta$ -secretase, é uma proteína integral de membrana do tipo 1 pertencente à família das aspartil proteases. É identificada como enzima 1 de clivagem do sítio  $\beta$  da APP (do inglês,  *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme 1*, BACE1).
- c.  $\gamma$ -secretases, foi identificada como um complexo enzimático composto por presenilina-1 e presenilina-2 (PS1 e PS2), nicastrina, *anterior pharynx-defective 1* (APH1) e potenciador de presenilina 2 (do inglês, *presenilin enhancer 2*, PEN-2).

A ação dessas enzimas dá origem a dois processos distintos, denominados de via amiloidogênica e via não-amiloidogênica (Figura 3). Na via mais comum, a não-amiloidogênica, a APP sofre ação dos complexos  $\alpha$ - e  $\gamma$ -secretases (Mohamed, Shakeri et al. 2016). Nesse caso, o complexo da  $\alpha$ -secretase cliva a proteína na posição do aminoácido 83 a partir da porção terminal-C, gerando um ectodomínio longo denominado sAPP $\alpha$ , que é secretado para o meio extracelular. A fração de 83 aminoácidos (C83) remanescente na membrana é subsequentemente clivada pelo complexo da  $\gamma$ -secretase, produzindo um fragmento curto denominado p3. É

importante ressaltar que a ação da  $\alpha$ -secretase ocorre na região de domínio da  $\beta$ -amilóide, prevenindo a formação da mesma.

Entretanto, na via amiloidogênica, a APP sofre ação dos complexos  $\beta$ - e  $\gamma$ -secretase (Mohamed, Shakeri et al. 2016). A clivagem exercida pela  $\beta$ -secretase ocorre na posição do aminoácido 99 a partir do terminal-C, liberando para o meio extracelular o fragmento sAPP $\beta$ , e deixando na membrana celular o fragmento de 99 aminoácidos (C99). Em seguida, C99 sofre a ação do complexo  $\gamma$ -secretase, gerando o peptídeo  $\beta$ -amilóide intacto.

Figura 3 – Representação das vias amiloidogênica e não-amiloidogênica



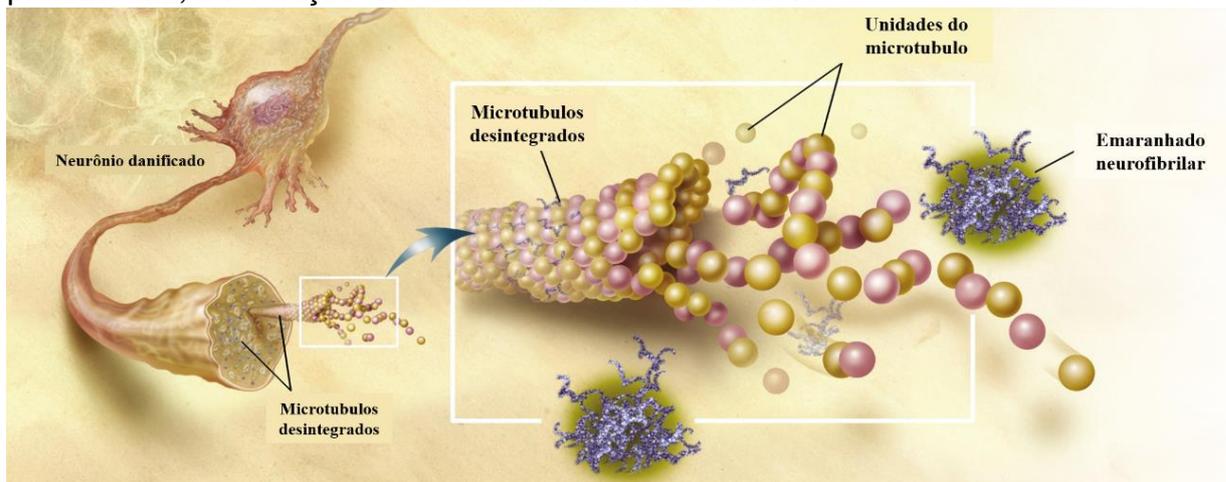
Fonte: Adaptado de Laferla, Green et al. (2007)

Esse processo acaba gerando fragmentos amiloides de 39 a 42 aminoácidos, aonde o fragmento mais abundante é o de 40 aminoácidos ( $\beta$ a 1-40), entretanto ele não está associado à formação das placas (Mattson 2004, Selkoe 2004, Finder and Glockshuber 2007). O fragmento mais hidrofóbico, e que apresenta maior propensão à formação de placas amiloides é o peptídeo  $\beta$ -amilóide que possui 42 aminoácidos ( $\beta$ a 1-42), e representa cerca de 10% dos fragmentos produzidos na clivagem da APP (Selkoe 2001, Laferla, Green et al. 2007).

### 2.1.3.2. Hipótese da *tau*

Outro fator também associado à DA é a formação de emaranhados neurofibrilares. Diferentemente das placas senis, esses emaranhados são observados intracelularmente, e são formados majoritariamente pela forma hiperfosforilada da proteína *tau* ( $\tau$ ) (Figura 4). Essa proteína foi descoberta a partir de microtúbulos isolados de células cerebrais, e inicialmente classificada como proteína associada à microtúbulos (do inglês, *microtubule-associated protein* – MAP), cuja função é fundamental na polimerização, estabilização e modulação dos microtúbulos (Naini and Soussi-Yanicostas 2015).

Figura 4 – Representação gráfica dos microtúbulos desestabilizados pela saída da proteína *tau*, e formação dos emaranhados neurofibrilares



Fonte: Google imagens, direitos de uso marcados para reutilização não comercial com modificações

Os microtúbulos são cilindros ocos com cerca de 24 nm de diâmetro externo e cerca de 12 nm de diâmetro interno. São responsáveis pela sustentação estrutural celular, bem como o transporte axonal de organelas, nutrientes, vesículas com neurotransmissores, e outros sinalizadores celulares, para manutenção da viabilidade celular (Naini and Soussi-Yanicostas 2015). Eles são formados pela polimerização de um dímero de duas proteínas globulares, a  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina, cuja estabilidade depende das MAP.

A proteína *tau* é uma fosfoproteína com 79 sítios de fosforilação potencial de Serina (Ser) e Treonina (Thr) na sua isoforma mais longa. A fosforilação de cerca de

30 sítios foi reportada em proteínas *tau* normais, sendo que o número de fosforilações é inversamente proporcional a solubilidade da proteína (Billingsley and Kincaid 1997). Esse processo é mediado por fosfatases, e é usado para controlar a estabilidade dos microtúbulos, bem como sua flexibilização.

A hiperfosforilação anormal da proteína *tau* a torna insolúvel, causando degeneração neurofibrilar devido ao impedimento da ligação com a tubulina, resultando na instabilização da estrutura dos microtúbulos. A proteína hiperfosforilada agrega-se em filamentos helicoidais pareados, principal constituinte dos emaranhados neurofibrilares (Lee, Perry et al. 2005).

A desestabilização dos microtúbulos parece estar associado a um declínio funcional dos neurônios (Lau, Chan et al. 2008) devido à falha no transporte axonal (pela perda da estrutura do citoesqueleto). Desta forma, como nutrientes e outros fatores importantes para manutenção celular não podem mais ser transportados através das células ocorre disfunção sináptica e consequente neurodegeneração (Roy, Zhang et al. 2005).

#### 2.1.3.3. Déficit colinérgico

O sistema de neurotransmissão colinérgica se dá através dos seguintes componentes: (1) o neurotransmissor acetilcolina (ACh); (2) acetilcolinesterase (AChE); (3); acetiltransferase (AChT), enzima que sintetiza a ACh e (4) receptores de ACh, especificadamente o receptor nicotínico (nAChR) e receptor muscarínico (mAChR).

Resumidamente, a ACh é sintetizada em determinados neurônios pela AChT a partir de colina e Acetil-CoA. Esse neurotransmissor é, então, liberado na fenda sináptica para se ligar aos receptores colinérgicos. A função da AChE é clivar a ACh novamente em seus metabólitos inativos colina e acetato para que não ocorra hiperexcitabilidade dos receptores.

Esse sistema é um dos primeiros responsáveis pela disfunção cognitiva e da memória no envelhecimento normal e na DA. Assim, com o intuito de aumentar os níveis de acetilcolina na fenda sináptica, novos fármacos capazes de reduzir a hidrólise da acetilcolina através da inibição da AChE foram desenvolvidos (Martorana, Esposito et al. 2010, Weinreb, Amit et al. 2016). Atualmente a hipótese hipocolinérgica é reforçada pelo uso desses inibidores aprovados pelo FDA (donepezila, rivastigmina

e galantamina), que demonstram melhorar os aspectos de cognição e memória dos pacientes com DA.

Outros estudos mostraram que camundongos transgênicos que superexpressam os genes da proteína presenilina (PS) (relacionada com a porção catalítica da  $\gamma$ -secretase) e APP, apresentam distrofia colinérgica e redução na atividade da enzima AChT no córtex e no hipocampo, implicando na diminuição da função colinérgica (Perez, Dar et al. 2007, Zaborszky, Pol et al. 2012).

#### 2.1.3.4. Neuroinflamação

Outro fator envolvido na DA é processo inflamatório, caracterizado pela ativação anormal de células da glia. Tecidos degenerados e materiais anormais altamente insolúveis são estimulantes clássicos da inflamação, dessa forma depósitos de  $\beta$ a e emaranhados neurofibrilares acabam estimulando a micróglia, ocorrendo a liberação de mediadores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, e fatores neurotóxicos, por exemplo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Akiyama, Barger et al. 2000). Estudos evidenciaram o desenvolvimento de neuroinflamação em vários estágios da doença, bem como a ativação do sistema imune e de células na estimulação da via inflamatória no sistema nervoso central (SNC) (Akiyama, Barger et al. 2000, Heneka and O'Banion 2007, Giunta, Fernandez et al. 2008, Rocha-Gonzalez, Ambriz-Tututi et al. 2008).

Esse processo neurodegenerativo ocorre num ciclo que se mantém ativo, iniciado pela secreção das citocinas, como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e as interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6, na resposta amiloidogênica, onde a ativação da micróglia e astrócitos aumentam a geração dessas citocinas, provocando um aumento no depósito de  $\beta$ a, que por sua vez ativará novas células gliais, perpetuando assim esse ciclo vicioso (Heneka and O'Banion 2007).

Além disso, análise post-mortem confirmaram a presença de microglia ativada e astrócitos reativos em torno dos depósitos de amiloide. Assim, também é interessante o uso de estratégias terapêuticas que possam modular a ativação da micróglia, astrócitos e do excesso na produção de fatores pró-inflamatórios e pró-oxidantes, para evitar o processo de neurodegeneração (Agostinho, Cunha et al. 2010, Choi, Aid et al. 2013).

### 2.1.3.5. Estresse oxidativo

Além disso, acredita-se também que o estresse oxidativo esteja envolvido na patologia da DA (Cai and Yan 2007), dessa forma, a utilização de compostos antioxidantes e anti-inflamatórios seria uma forma de prevenir ou tratar essa doença.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem um papel importante em seres vivos. Um exemplo de suas funções no organismo é na resposta imune a infecções. Os fagócitos em geral possuem um mecanismo de defesa contra corpos estranhos onde ocorre um alto consumo de oxigênio, geralmente denominado queima ou explosão respiratória. Nesse processo, o oxigênio consumido é convertido em ânion superóxido através do complexo da NADPH oxidase, que é usado para eliminar bactérias e partículas engolfadas pelos fagócitos, no processo chamado de fagocitose (Halliwell and Gutteridge 1990, Halliwell 1991). Há evidências de que as EROs também desempenham um papel importante na sinalização celular (Ray, Huang et al. 2012).

O SNC é particularmente vulnerável aos danos causados pelos radicais livres por apresentar alto consumo de oxigênio e possuir grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e menor atividade de enzimas antioxidantes quando comparado a outros tecidos (Bains and Shaw 1997, Bourdel-Marchasson, Delmas-Beauvieux et al. 2001). Além disso, ocorre um aumento na produção de EROs e disfunções no sistema antioxidante em cérebros durante o envelhecimento, levando à um desequilíbrio no status redox e conseqüentemente ao estresse oxidativo (Andreyev, Kushnareva et al. 2005). Desta forma, com o avanço da idade, o cérebro sofre mudanças morfológicas e funcionais, afetando filamentos dendríticos e sinapses, neurotransmissão, circulação e metabolismo, alterando o sistema motor e sensorial, de memória e aprendizado (Mariani, Polidori et al. 2005, Zhu, Lee et al. 2007).

A  $\beta$ A também desenvolve papel importante no aumento do estresse oxidativo em portadores de DA. Na mitocôndria, esta proteína inibe a cadeia transportadora de elétrons, diminui a taxa respiratória e induz a liberação de EROs (Migliore, Fontana et al. 2005, Chauhan and Chauhan 2006).

Além disso, a peroxidação lipídica parece preceder a formação dos emaranhados neurofibrilares, formados pela proteína *tau* hiperfosforilada. Embora essa proteína normalmente regule a formação do microtúbulo, mantendo normal o calibre dos axônios, quando hiperfosforilada, essa proteína não somente perde a

função de estabilizar os microtúbulos, como também passa a aumentar o estresse oxidativo por sequestrar as proteínas *tau* normais, resultando na destruição dos microtúbulos (Sayre, Perry et al. 2008).

Evidências também sugerem o envolvimento de metais, como ferro, zinco e cobre, na formação de placas amiloides e neurodegeneração (Kozlowski, Janicka-Klos et al. 2009), visto que há afinidade do cobre e zinco por sítios de ligação na A $\beta$  e na APP (Miura, Suzuki et al. 2000, Barnham, McKinstry et al. 2003). O cobre também está envolvido na formação de radicais hidroxila (OH $\bullet$ ), e o mesmo foi encontrado em altas concentrações em placas amiloides (Valko, Morris et al. 2005, Strozyk, Launer et al. 2009).

#### **2.1.4. Modelos animais para estudo da DA**

Diversas espécies de animais, incluindo cachorros, gatos, ursos, cabras, ovelhas e primatas, desenvolvem espontaneamente patologias relacionadas ao depósito de placas amiloides, e algumas espécies também apresentam taupatias (Braak, Braak et al. 1994, Tekirian, Cole et al. 1996, Gunn-Moore, McVee et al. 2006, Rofina, van Ederen et al. 2006, Lemere, Oh et al. 2008). Entretanto, o uso desses animais é muito limitado, devido a sua disponibilidade, fatores econômicos e éticos.

Dessa forma, outros modelos animais foram desenvolvidos a fim de minimizar o custo e adequar-se as normas éticas impostas. Uma das formas encontradas para estudar a DA foi a indução de lesões em cérebros de roedores através do uso de químicos ou fármacos. Um dos modelos mais usados é a amnésia induzida por escopolamina (Flood and Cherkin 1986), o qual aumentou o conhecimento sobre o papel do sistema colinérgico na cognição, bem como a avaliação de compostos com suposta atividade inibitória da AChE (Wong, Ho et al. 2010).

Através da hipótese amiloidogênica, cujo acúmulo de A $\beta$  e formação de placas amiloides são vistos como principal causa da doença, se desenvolveu o modelo de infusão desse peptídeo por via intracerebral ou intracerebroventricular (Lawlor and Young 2011). Essa administração pode ocorrer de forma aguda, com apenas uma injeção através de estereotáxico, ou de forma crônica, através de uma cânula implantada no cérebro desses animais (Harkany, O'Mahony et al. 1998, Harkany, Abraham et al. 2000, Yamada, Chiba et al. 2005).

A administração intracerebral da A $\beta$  causa déficit de aprendizagem e memória, bem como alterações comportamentais semelhante a DA. A severidade das alterações depende da espécie de fragmento utilizado, bem como o intervalo entre as administrações e os testes comportamentais (Yamada, Chiba et al. 2005, Sipos, Kurunczi et al. 2007). Desta forma, há uma grande variabilidade nos comportamentos e neuropatologia reportados em trabalhos usando esse tipo de modelo animal, provavelmente devido a variações metodológicas, a espécie do peptídeo injetado (e.g. A $\beta$ <sub>1-40</sub>, A $\beta$ <sub>1-42</sub>, A $\beta$ <sub>25-35</sub>), o estado de agregação e concentração dos peptídeos, duração e local da infusão, intervalo entre a administração e testes comportamentais e até mesmo o solvente utilizado (Lawlor and Young 2011).

Com a evolução do mapeamento genético, genes envolvidos na patogênese da DA familiar começaram a ser descobertos, e novos modelos para estudo da doença foram desenvolvidos. Através da técnica de transgênese, modelos manipulados geneticamente começaram a surgir, levando à criação de espécies cujo fenótipo é semelhante à DA em humanos.

Dentro dessas espécies, podemos citar a *Drosophila melanogaster*, também conhecida como mosca-da-fruta, o *Caenorhabditis elegans*, nematódeo encontrado (Van Dam and De Deyn 2011).

Em roedores, as primeiras espécies desenvolvidas foram na década de 1990, especialmente os modelos de camundongos Tg2576 e APP23 (Hsiao, Chapman et al. 1996, Sturchler-Pierrat, Abramowski et al. 1997). Ambos expressam a mutação suéca do gene APP humano e suportam a hipótese amiloidogênica, demonstrando sinais relacionados à DA. Com a descoberta da mutação do gene da presenilina (PS) em pacientes com EOAD, surgiram modelos de camundongos transgênicos para PS1 e PS2, que apresentam uma maior relação A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub>, porém proporcionam poucas anormalidades cognitivas e comportamentais (Elder, Gama Sosa et al. 2010, Van Dam and De Deyn 2011).

Esses animais serviram como base para o surgimento de modelos duplo-transgênico APP/PS, que além de apresentar maior relação A $\beta$ <sub>1-42</sub>/A $\beta$ <sub>1-40</sub>, também oferecem uma patologia amiloidogênica mais acelerada quando comparados com o modelo APP, suportando a importância do papel da presenilina modificada. Ademais, esse modelo transgênico exibe perda neuronal, inflamação associada a formação de placas amiloides, declínio cognitivo e alterações comportamentais (McGowan, Eriksen et al. 2006, Van Dam and De Deyn 2006).

Infelizmente, esse modelo não apresenta taupatia, sinal característico do desenvolvimento da doença em pacientes com DA. Isso foi contrabalanceado com o desenvolvimento de camundongos triplo transgênico (3xTg) (Oddo, Caccamo et al. 2003), que apresentam mutações nos genes *APP*, *PS1* e *tau*. Em concordância com a teoria amiloide, esses animais desenvolvem as placas amiloide previamente ao aparecimento de emaranhados neurofibrilares (Oddo, Caccamo et al. 2003), além de apresentar um perfil de memória espacial e temporal semelhante ao visto na DA, bem como neuroinflamação, disfunção sináptica e declínio cognitivo (Sy, Kitazawa et al. 2011).

### 2.1.5. Tratamentos para Doença de Alzheimer

Diversas abordagens foram tomadas na tentativa de tratar ou retardar o avanço da DA. Entre elas, podemos citar agentes quelantes de metais, tais como a desferroxiamina, que foi aprovada pelo FDA para tratamento de hemocromatose. Esse composto tem a capacidade de quelar e eliminar  $Fe^{+3}$  do cérebro (Keberle 1964, Cuajungco, Faget et al. 2000), bem como combinar-se moderadamente com alumínio, zinco e cobre (Olivieri and Brittenham 1997). Porém, a maioria dos quelantes não mostra especificidade para os íons metálicos complexados com  $A\beta$ , levando à quelação indiscriminada de vários biometais e ao aparecimento de graves efeitos adversos devido ao uso prolongado desses compostos (Dedeoglu, Cormier et al. 2004).

Outra possibilidade de tratamento encontrada para retardar o avanço da doença foi através do desenvolvimento de inibidores das secretases, enzimas envolvidas na clivagem da APP e produção de  $A\beta$ . Os principais alvos são a  $\beta$ -secretase e a  $\gamma$ -secretase. Como a  $\beta$ -secretase (BACE-1) é uma enzima que inicia a produção de  $A\beta$ , ela passou a ser um alvo terapêutico para DA, porém alguns compostos produzidos para inibir a atividade dessa enzima também mostraram patologias não relacionadas à DA e tiveram o estudo descontinuado (Vassar 2014).

Dentre as estratégias anti-amiloide, a imunoterapia vem sendo estudada e considerada como a mais promissora para o tratamento da DA, já que possibilita o desenvolvimento de anticorpos cujo alvo são porções altamente específicas do peptídeo. Recentes avanços na engenharia de proteínas, bem como a produção de proteínas recombinantes, tornaram viáveis as produções de anticorpos específicos

para uso terapêutico (Lannfelt, Relkin et al. 2014). Os resultados mais promissores foram testes utilizando anticorpo monoclonal recombinante humano, de alta afinidade contra A $\beta$ , capaz de reconhecer os aminoácidos (3 ao 6) N-terminal do peptídeo A $\beta$ . Este anticorpo mostrou benefícios dose dependente em remover A $\beta$  e melhorar a cognição (ALZFORUM 2015).

Em relação à proteína *tau* e os emaranhados neurofibrilares, estudos focam principalmente o desenvolvimento de agentes capazes de inibirem e/ou reverterem à formação dos filamentos helicoidais pareados e também o desenvolvimento de inibidores de quinases, responsáveis pela hiperfosforilação da *tau*. As principais quinases responsáveis pelo processo de fosforilação da *tau* são: glicogênio sintase quinase 3-beta (GSK-3 $\beta$ ), caseína quinase 1 (CK-1) e quinase dependente de ciclina 5 (Cdk5), sendo a primeira amplamente estudada (Lansdall 2014).

Quanto ao uso de anti-inflamatórios para modulação da neuroinflamação, as triagens clínicas prospectivas falharam em demonstrar efeitos positivos do uso dos tradicionais anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e também dos inibidores seletivos de ciclo-oxigenase 2 (COX 2) no tratamento ou prevenção da DA. Entre os compostos testados, podemos citar rofecoxib, naproxeno, indometacina e ibuprofeno (Tabet and Feldmand 2003, Yiannopoulou and Papageorgiou 2013).

Dentre os tratamentos aprovados para uso humano, os inibidores da AChE ainda são os mais receitados para pacientes com DA. Eles retardam a degradação metabólica da acetilcolina, otimizando a disponibilidade deste substrato para a comunicação entre as células. Isto auxilia no retardo da progressão da disfunção cognitiva e pode ser eficaz para alguns pacientes nos estágios inicial e intermediário da doença (Anand and Singh 2013). Existem hoje quatro medicamentos pertencentes a esta classe, aprovados pela FDA: tacrina (uso descontinuado em 2013), donepezila, rivastigmina e galantamina (Ellul, Archer et al. 2007, Cunningham and Passmore 2013).

Outra abordagem para retardar a doença, é a utilização de antioxidantes em combinação com medicamentos a fim de atuar em mais de um fator relacionado ao desenvolvimento da DA. Nesse sentido, antioxidantes lipofílicos, como o  $\alpha$ -tocoferol, foram utilizados com algum sucesso em alguns estudos clínicos envolvendo pacientes portadores da doença de Alzheimer (Barnes and Yaffe 2005). Os resultados de um estudo indicaram que os indivíduos com DA de leve a moderada que receberam altas

doses de vitamina E tiveram uma taxa 19% mais lenta de declínio funcional (Dysken, Guarino et al. 2014).

Apesar de diversos estudos em novas substância abrangendo possíveis vias patológicas da DA, nenhum medicamento foi capaz de desacelerar o progresso da doença ou reverter seu dano, por isso o estudo de novas substâncias é importante para o entendimento e tratamento da doença.

## **2.2. SELÊNIO**

### **2.2.1. Histórico, abundância e importância**

O selênio (Se) foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jöns Jacob Berzelius. Esse elemento, número 34 na tabela periódica, é classificado com um não metal ou ametal e é raramente encontrado na sua forma elementar na natureza (Boyd 2011). Inicialmente ele foi confundido com telúrio, por ter propriedades semelhantes, conferir um odor característico e por geralmente ambos serem encontrados juntos em minérios.

A maior parcela de selênio é extraída como subproduto do beneficiamento de cobre. Comercialmente ele é utilizado principalmente como aditivo em vidro, conferindo uma coloração bronze ou vermelha, dependendo do mineral utilizado, reduzindo a transmissão de luz solar em vidro arquitetural. Além disso, o Se possui ambas propriedades fotovoltaica (converte luz em eletricidade) e ação fotocondutora (reduz a resistência elétrica com incidência de luz), dessa forma também é utilizado em fotocélulas, painéis solares e como semicondutor. O selênio ainda é adicionado como coadjuvante em xampus anticaspa por ser tóxico ao fungo causador (Royal Society of Chemistry 2016).

Por muito tempo, acreditava-se que o selênio era tóxico, e não possuía nenhum papel no organismo humano. Essa visão sobre esse elemento mudou após a descoberta de proteínas contendo selênio na sua estrutura, as chamadas selenoproteínas (McLaren 1999, Mehdi, Hornick et al. 2013).

Diversos alimentos incorporam o selênio em sua composição através dos minerais presentes no solo, dessa forma, o consumo de vegetais cultivados em solos com baixa concentração de selênio pode levar a deficiências nutricionais do mesmo, culminando em susceptibilidade a doenças em determinadas populações (Combs

2001). Isso pode ser evidenciado pela Doença de Keshan, região na China na qual a população desenvolveu uma cardiomiopatia congestiva devido à combinação da deficiência de selênio na dieta e a presença de uma cepa do *Coxsackievirus* (Harthill 2011, Loscalzo 2014).

Tabela 1 – Exemplos de quantidades de Se contidas em alguns alimentos de origem animal e vegetal.

Alimentos de origem vegetal			Alimentos de origem animal		
Alimento	NDB No	Se (µg)	Alimento	NDB No	Se (µg)
Abacaxi	09266	0,12	Carne de Frango	05748	40,20
Agrião	11591	0,90	Carne de gado	13806	27,10
Alface	11253	0,60	Carne de peru	05293	25,70
Alho	11215	14,20	Carne de porco	10981	33,70
Banana	09040	1,00	logurte	43261	6,00
Batata	11367	0,30	Leite	01078	2,00
Brócolis	11742	1,60	Manteiga	01001	1,00
Cebola	11282	0,50	Ovo	01128	33,10
Feijão	16005	5,70	Presunto	07028	31,60
Laranja	09200	0,50	Queijo	01026	17,00
Lentilha	16370	2,80	Salmão	15083	31,40
Melancia	09326	0,40	Sardinha	15088	52,70

Fonte: United States Department of Agriculture (2016)

NDB No: Nutrient Database Number (número de referência ao alimento selecionado na tabela). Os valores de Se referem-se a porções de 100g de alimento.

Em geral, produtos de origem animal apresentam uma concentração maior de Se (Tabela 1), sendo a principal fonte na alimentação brasileira, visto que os produtos de origem vegetal comumente consumidos no país possuem teores mais baixos do mineral (Ferreira, Gomes et al. 2002). Outro produto nacional que se destaca entre alimentos ricos em selênio é a castanha-do-pará (*Brazil nut*, em inglês). Essa oleaginosa possui cerca de 1900 µg de Se em 100 g (NDB No 12078) de acordo com a mesma lista publicada pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (do inglês, *United States Department of Agriculture*, USDA) em 2015.

Mesmo assumindo uma dieta vegetariana é possível obter os níveis diários adequados para o selênio, desde que o consumo de alimentos seja bastante variado, já que não houve deficiência de Se no plasma e eritrócitos em grupo de indivíduos vegetarianos (de Bortoli and Cozzolino 2009). Alimentos de origem vegetal industrializados muitas vezes são enriquecidos com minerais e vitaminas e podem

também ser usados para suprir as necessidades básicas do mineral. Por exemplo, uma porção de 100g de um tipo de cereal matinal comercial pode fornecer 29 µg de Se (United States Department of Agriculture 2016).

Ainda há dúvidas em relação aos níveis ideais para o consumo humano de Se diário. Entretanto, esses níveis foram estabelecidos e são relativamente fáceis de serem atingidos. Na Tabela 2 estão apresentados os valores para ingestão recomendada e limite máximo tolerado de Se para indivíduos homens e mulheres a partir de 1 ano de idade. Para gestantes e durante a amamentação, os níveis recomendados são acrescidos em 5 e 15 µg de Se por dia, respectivamente, de acordo com a mesma fonte.

Tabela 2 – Dose recomendada e limite máximo tolerado de Se de acordo com a idade (a partir de 1 ano).

<b>Faixa de idade (anos)</b>	<b>Recomendações de doses alimentares (RDA, diário)</b>	<b>Limites de ingestão máxima tolerável (UL, diário)</b>
<b>1 – 3</b>	20 µg	90 µg
<b>4 – 8</b>	30 µg	150 µg
<b>9 – 13</b>	40 µg	180 µg
<b>14 – 18</b>	55 µg	400 µg
<b>19 – 30</b>	55 µg	400 µg
<b>31 – 50</b>	55 µg	400 µg
<b>51 – 70</b>	55 µg	400 µg
<b>&gt; 70</b>	55 µg	400 µg

Fonte: Institute of Medicine (2000)

RDA: Recommended Dietary Allowance; UL: Tolerable Upper Intake Level.

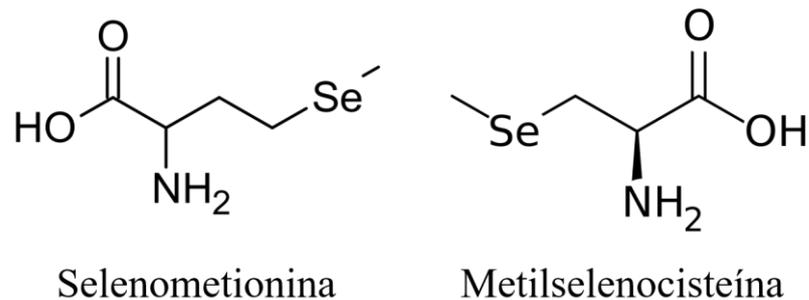
Portanto, o consumo diário de ambos alimentos de origem animal e vegetal são importantes para manter os níveis de Se, pois o conteúdo de Se nos alimentos pode sofrer alteração devido vários fatores como o conteúdo proteico, processamento, mudanças sazonais e procedimento de cocção empregado (Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique 2008).

### **2.2.2. Selênio no organismo**

A biodisponibilidade, função e toxicidade do selênio dependem da forma química na qual ele se apresenta. Apesar de selênio inorgânico ser encontrado em minérios nas formas de seleneto e selenato, as principais formas orgânicas são

selenoaminoácidos, selenopeptídeos e selenoproteínas (Maseko, Callahan et al. 2013). Dessa forma, pode se dizer que a fisiologia ou bioquímica do selênio orgânico é mediado pela incorporação do mesmo em selenoproteínas. Em plantas, a maior parte do selênio é encontrado na forma de selenoaminoácidos como selenometionina e metilselenocisteína (Dumont, Vanhaecke et al. 2006) (Figura 5).

Figura 5 – Estruturas químicas da selenometionina e metilselenocisteína



Fonte: Google imagens, direitos de uso marcados para reutilização não comercial com modificações

Em humanos, o Se está presente em diversas enzimas denominadas selenoproteínas, as quais apresentam a selenocisteína no seu sítio ativo (Hatfield, Tsuji et al. 2014). Essas enzimas estão presentes nos mais diversos tecidos, e incluem deiodinases, tiroxina redutases e glutathione peroxidases (Mehdi, Hornick et al. 2013).

Tabela 3. Selenoproteínas de mamíferos, suas abreviaturas, tecidos e compartimentos celulares encontradas e principais funções/ações desempenhadas.

Selenoproteína	Abreviatura (no inglês)	Tecido	Compartimento celular	Principais funções/ações
Glutathione peroxidase 1	GPx1	Onipresente, altamente expressa em eritrócitos, fígado, rim, pulmão	Citoplasma	Glutathione peroxidase citosólica
Glutathione peroxidase 2	GPx2	Fígado, epitélio do trato gastrointestinal	Citoplasma	Glutathione peroxidase gastrointestinal
Glutathione peroxidase 3	GPx3	Plasma	Secretada	Glutathione peroxidase plasmática
Glutathione peroxidase 4	GPx4	Testículos	Citoplasma, mitocôndria, núcleo	Fosfolípido hidroperóxido glutathione peroxidase
Glutathione peroxidase 6	GPx6	Epitélio, olfatório, embriões	Secretada	Glutathione peroxidase com ação no epitélio olfatório
Tioredoxina redutase 1	TR1, TrxR1, TxnRd1	Onipresente	Citoplasma, núcleo	Redução da tioredoxina citosólica
Tioredoxina/Glutathione redutase	TGR, TR2, TrxR3, TxnRd3	Testículos	Citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático, microsomo	Tioredoxina redutase testículo-específica

<b>Tioredoxina redutase 3</b>	TR3, TrxR2, TxnRd2	Onipresente, altamente expressa na próstata, ovário, fígado, testículos, útero, cólon, intestino delgado	Mitocôndria	Redução da tioredoxina e glutarredoxina mitocondrial
<b>Metionina sulfóxido redutase</b>	MsrB1, SelR, SelX	Coração, fígado, músculo, rim	Citoplasma, núcleo	Redução de resíduos de metionina oxidada
<b>Selenofosfatase sintetase 2</b>	SPS2	Fígado	Citoplasma	Síntese da selenofostase
<b>Iodotironina deiodinase 1</b>	DI1, D1, Dio1	Fígado, rim, tireoide, glândula pituitária, ovários	Retículo endoplasmático e membrana plasmática	Ativadora do hormônio da tireoide iodotironina deiodinase
<b>Iodotironina deiodinase 2</b>	DI2, D2, Dio2	Tireoide, coração, cérebro, cordão espinhal, músculo esquelético, placenta, rim, pâncreas	Membrana do retículo endoplasmático	Ativadora tecido-específica do hormônio da tireoide iodotironina deiodinase
<b>Iodotironina deiodinase 3</b>	DI3, D3, Dio3	Placenta, tecidos fetais, pele	Membrana celular e endossomal	Desativadora tecido-específica do hormônio da tireoide iodotironina deiodinase
<b>Selenoproteína N</b>	SelN, SEPN1, SepN	Onipresente, abundante no músculo esquelético, cérebro, pulmão, placenta	Membrana do retículo endoplasmático	Suposto papel durante o desenvolvimento muscular
<b>Selenoproteína P</b>	SelP	Expressa no fígado, coração e cérebro; secretada no plasma; Encontrada também no rim	Secretada	Transporte de Se
<b>Selenoproteína 15 kDa</b>	Sep15	Altos níveis na próstata e na tireoide; Pulmão, cérebro, rim	Lúmen do retículo endoplasmático	Suposto papel no "controle de qualidade" do dobramento de proteínas no retículo endoplasmático
<b>Selenoproteína M</b>	SelM	Principalmente no cérebro; Rim, pulmão e outros tecidos	Região perinuclear, lúmen do retículo endoplasmático, aparato de Golgi	Desconhecido
<b>Selenoproteína K</b>	SelK	Vários tecidos; abundante no coração	Membrana do retículo endoplasmático	Suposto papel na degradação associada ao retículo endoplasmático
<b>Selenoproteína S</b>	SelS, SEPS1, VIMP	Plasma, vários tecidos	Membrana do retículo endoplasmático	Suposto papel na degradação associada ao retículo endoplasmático
<b>Selenoproteína O</b>	SelO	Vários tecidos	Desconhecida	Desconhecido
<b>Selenoproteína W</b>	SelW, SEPW1	Vários tecidos, abundante nos músculos	Citoplasma	Desconhecido
<b>Selenoproteína T</b>	SelT	Onipresente	Retículo endoplasmático, aparato de Golgi	Desconhecido

<b>Selenoproteína H</b>	SeIH	Vários tecidos, principalmente expressa em células embrionárias e tumorais	Núcleo	Desconhecido
<b>Selenoproteína V</b>	SeIV	Testículos	Desconhecida	Desconhecido. Expressão testículo-específica
<b>Selenoproteína I</b>	SeII	Vários tecidos; abundante no encéfalo	Membrana do retículo endoplasmático	Desconhecido

Fonte: adaptado de Kryukov, Castellano et al. (2003), Hatfield, Tsuji et al. (2014) e Roman, Jitaru et al. (2014)

O metabolismo do Se ainda é pouco descrito, em comparação com outros nutrientes (Fairweather-Tait, Bao et al. 2011). Porém, as rotas e mecanismo básicos de absorção e metabolismo do mineral já estão descritas. Simplificadamente, a absorção do Se acontece principalmente no duodeno e no ceco e, em humanos, a excreção ocorre principalmente através da urina (Mehdi, Hornick et al. 2013), sendo que os níveis de Se na urina e no plasma refletem de forma rápida variações no consumo do mineral (Hawkes, Alkan et al. 2003).

Há trabalhos que mostram a diferença no acúmulo de selênio em diversos órgãos. Um estudo feito em vinte tecidos humanos mostrou que o órgão que mais acumula Se é a glândula tireoide, e o fígado possui uma concentração menor do que músculos (Dickson and Tomlinson 1967). Entretanto, um estudo mais recente mostra que os órgãos que possuem maior concentração do mineral, em ordem decrescente, são rins, fígado, baço, pâncreas, coração, cérebro, pulmão, osso e músculo esquelético (Zachara, Pawluk et al. 2001). O mesmo estudo mostra que a maior proporção do conteúdo total de selênio encontra-se nos músculos (27,5%), seguido dos ossos (16%) e sangue (10%), e que tecidos cancerosos apresentaram uma concentração menor de Se quando comparados com o tecido saudável.

Deficiências de Se causam diversos distúrbios metabólicos em seres humanos (Mehdi, Hornick et al. 2013), como a Doença de Keshan, citada previamente. Por outro lado, o excesso desse mineral também pode ser tóxico (Spiller and Pfeifer 2007, Mézes and Balogh 2009, MacFarquhar, Broussard et al. 2010), causando a chamada selenose. De acordo com a Agência para Substância Tóxicas e Registro de Doenças dos EUA (do inglês, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR), os sinais da selenose são odor gálico, além de desordem gastrointestinal, queda capilar, descamação das unhas, fadiga, irritabilidade e dano neurológico (Risher, McDonald et al. 2003).

O metabolismo do Se ainda é pouco conhecido, e apesar de haver recomendação de consumo diária para esse mineral, ainda é difícil definir o que representa um estado nutricional de Se “normal”, mesmo porque os parâmetros adequados para avaliar esse estado também não estão bem definidos (Roman, Jitaru et al. 2014). Além do mais, cada pessoa possui suas particularidades quanto a aspectos genéticos, estado de saúde ou doenças, fatores que podem influenciar nas necessidades individuais de ingestão do mineral (Rayman 2008).

É importante lembrar que estudar a biodisponibilidade do mineral, e não apenas sua quantidade no alimento, é de extrema importância para definir a necessidade do consumo desse mineral (Finley 2006). De forma geral, estima-se que entre 70 e 80% do Se consumido através dos alimentos é absorvido (Bugel, Larsen et al. 2008, Navarro-Alarcon and Cabrera-Vique 2008), especialmente quando ingerido na forma de selenometionina (Burk, Norsworthy et al. 2006).

A interação do Se com outros nutrientes também deve ser levada em consideração. Sabe-se, por exemplo, que a vitamina B12 aumenta a excreção de Se (Gad and Abd El-Twab 2009). Já a anemia causada pela deficiência de ferro pode aumentar a retenção de Se (Diaz-Castro, Ojeda et al. 2011). O monitoramento do estado nutricional de Se também é muito importante nessas situações, podendo ser realizado através da análise dos níveis do mineral no sangue total, plasma, soro, urina, cabelo e unhas, tendo cada uma dessas metodologias vantagens e desvantagens específicas (Hays, Macey et al. 2014).

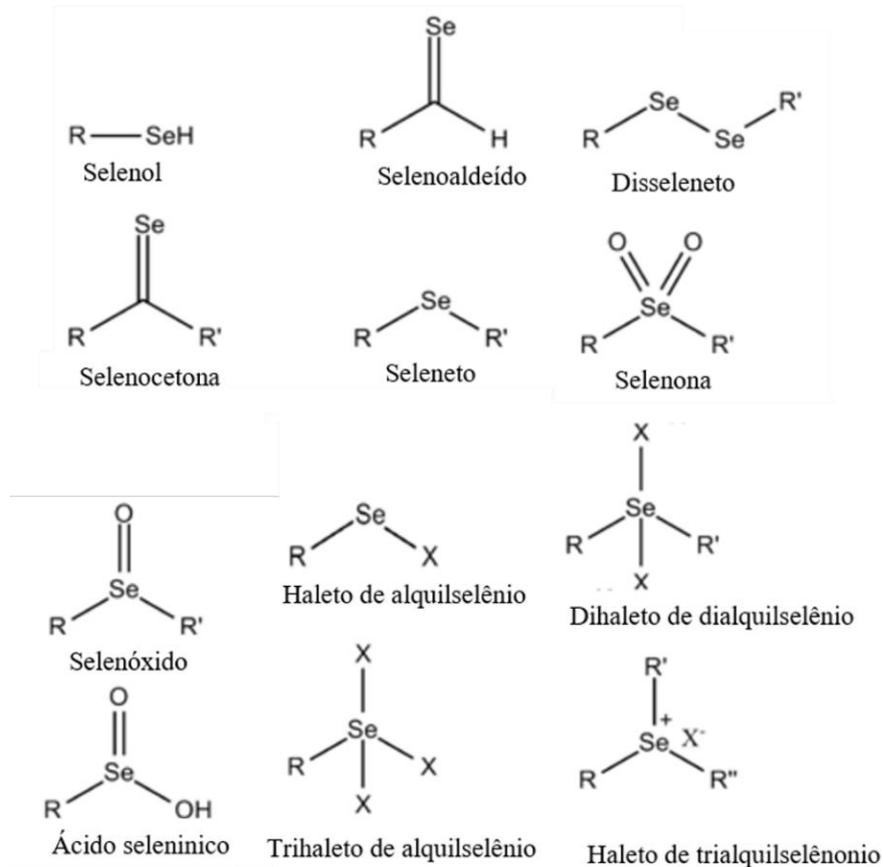
### **2.2.3. Compostos orgânicos de selênio e neuroproteção**

Compostos orgânicos de selênio podem ser definidos como compostos químicos que contenham ambos selênio e carbono. Outros elementos, tais como halogênio, oxigênio, enxofre ou nitrogênio também estão frequentemente presentes nessas estruturas (Figura 6).

Alguns compostos orgânicos de selênio já demonstraram ter a capacidade de mimetizar compostos naturais apresentando propriedades biológicas importantes, e.g., propriedade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral (Shamberger 1983, Nicolau and Petasis 1984). Wollenhaupt et al. (2014) demonstrou que compostos análogos de selênio e telurofuranosídeos protegeram contra a toxicidade induzida por

manganês em nematódeos *Caenorhabditis elegans*, levando a translocação nuclear do fator de transcrição DAF-16/FOXO, regulando a resposta ao estresse, envelhecimento e metabolismo (Wollenhaupt, Soares et al. 2014).

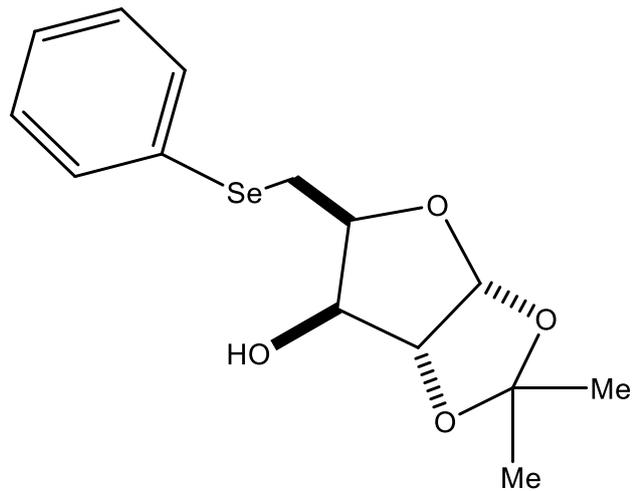
Figura 6 – Estruturas químicas simplificadas de compostos orgânicos de selênio



Fonte: Adaptado de McKillop (2002)

O selenofuranosídeo (Figura 7), composto que foi utilizado nessa tese, já foi testado em um modelo de intoxicação por cádmio em camundongas, onde ele foi capaz de impedir a redução da atividade da enzima  $\delta$ -aminolevulinato desidratase ( $\delta$ -ALA-D). Compostos semelhantes, como o disseleneto de difenila, também demonstraram capacidade de neutralização de espécies reativas através da formação do radical selonelato ( $RSe^{-1}$ ), podendo ser uma das formas de ação do selenofuranosídeo.

Figura 7 – Estrutura química do selenofuranosídeo



Fonte: Adaptado de Braga, Stefani et al. (2010)

Devido as propriedades demonstradas por outros compostos orgânicos de selênio semelhantes, e pelo próprio selenofuranosídeo, esse composto parece promissor para estudos onde o estresse oxidativo e a inflamação estejam envolvidos na patogênese. Com esse intuito, decidimos testar essa substância em diferentes modelos animais para demência esporádica do tipo Alzheimer.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do composto orgânico de selênio, selenofuranosídeo, em diferentes modelos animais de Doença de Alzheimer sobre a memória, estresse oxidativo e inflamação.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito a curto prazo no uso do composto selenofuranosídeo em camundongos Swiss albino submetidos a administração do fragmento do peptídeo  $\beta$ -amiloide (25-35) por via intracerebroventricular sobre a memória aversiva ao medo e memória espacial, bem como marcadores pró-oxidativos (espécies reativas, peroxidação lipídica), marcadores pró-inflamatórios (citocinas) e atividade enzimática em tecido cerebral de enzimas antioxidantes e acetilcolinesterase
- Avaliar o efeito a longo prazo no uso do composto selenofuranosídeo em camundongos transgênicos que expressam os genes humanos *APP* e *PS1* sobre memória espacial, memória de reconhecimento social e comportamento tipo ansioso, bem como presença de peptídeos da  $A\beta$ , placas amiloides e ativação glial em fatias histológicas cerebrais.

## 4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de um artigo científico e um manuscrito. As seções *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão dos Resultados* e *Referências Bibliográficas* encontram-se no próprio artigo e no manuscrito.

O primeiro artigo está apresentado como foi publicado sob o título “*Selenofuranoside Ameliorates Memory Loss in Alzheimer-Like Sporadic Dementia: AChE Activity, Oxidative Stress, and Inflammation Involvement*” na revista “***Oxidative Medicine and Cellular Longevity***”.

O restante dos resultados, obtidos através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) oferecido pela CAPES, está apresentado no formato de manuscrito que será submetido após considerações da banca. Esses resultados foram obtidos no “*Laboratory of Biological Psychology*” da Universidade Católica de Leuven, Bélgica, sob a supervisão do Prof. Dr. Rudi D’Hooge.

## Research Article

# Selenofuranoside Ameliorates Memory Loss in Alzheimer-Like Sporadic Dementia: AChE Activity, Oxidative Stress, and Inflammation Involvement

Cristiano Chiapinotto Spiazzi,<sup>1</sup> Melina Bucco Soares,<sup>1</sup>  
 Aryele Pinto Izaguirry,<sup>1</sup> Laura Musacchio Vargas,<sup>1</sup> Mariane Magalhães Zanchi,<sup>1</sup>  
 Natasha Frasson Pavin,<sup>1</sup> Ricardo Ferreira Affeldt,<sup>2</sup> Diogo Seibert Lüdtkke,<sup>2</sup>  
 Marina Prigol,<sup>3</sup> and Francielli Weber Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (Biotech), Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Uruguaiiana, 97500-970 Uruguaiiana, RS, Brazil

<sup>2</sup>Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Avenida Bento Gonçalves 9500, 91501-970 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas (LaftamBio), Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Campus Itaqui, 97.650-000 Itaqui, RS, Brazil

Correspondence should be addressed to Francielli Weber Santos; francielliweber@yahoo.com.br

Received 10 December 2014; Revised 17 April 2015; Accepted 10 May 2015

Academic Editor: Neelam Khaper

Copyright © 2015 Cristiano Chiapinotto Spiazzi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Alzheimer's disease (AD) is becoming more common due to the increase in life expectancy. This study evaluated the effect of selenofuranoside (Se) in an Alzheimer-like sporadic dementia animal model. Male mice were divided into 4 groups: control, A $\beta$ , Se, and A $\beta$  + Se. Single administration of A $\beta$  peptide (fragments 25–35; 3 nmol/3  $\mu$ L) or distilled water was administered via intracerebroventricular (i.c.v.) injection. Selenofuranoside (5 mg/kg) or vehicle (canola oil) was administered orally 30 min before A $\beta$  and for 7 subsequent days. Memory was tested through the Morris water maze (MWM) and step-down passive-avoidance (SDPA) tests. Antioxidant defenses along with reactive species (RS) were assessed. Inflammatory cytokines levels and AChE activity were measured. SOD activity was inhibited in the A $\beta$  group whereas RS were increased. AChE activity, GSH, and IL-6 levels were increased in the A $\beta$  group. These changes were reflected in impaired cognition and memory loss, observed in both behavioral tests. Se compound was able to protect against memory loss in mice in both behavioral tests. SOD and AChE activities as well as RS and IL-6 levels were also protected by Se administration. Therefore, Se is promising for further studies.

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a chronic neurodegenerative pathology mainly related to aging and it represents the most common form of dementia [1]. It is characterized by its progressive and slow deterioration in cognition, memory, functional ability, behavior, and mood.

Several mechanisms are involved in AD pathology, such as the presence of neurofibrillary tangles, inflammation processes, and neuronal degeneration. Nevertheless, one of the major characteristics of AD is the presence of senile plaques

in brain regions. These plaques are formed by a dense core of aggregated amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptide. This peptide is formed by proteolytic process of amyloid precursor protein (APP) by the action of  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase, and it may vary between 39 and 43 amino acid residues [2].

The 25–35 A $\beta$  (A $\beta$ <sub>25–35</sub>) fragment is regarded as the cytotoxic sequence of the parent peptide due to its high level of aggregation, and it retains the toxicity of the total length of the peptide. Possibly, its toxicity may be influenced by the redox state of terminal-C methionine [3], which could be affected by high levels of reactive species.

Furthermore, many studies have demonstrated the relationship between AD and neuroinflammation, which may be a consequence of a systemic inflammatory process that occurs throughout life, mainly related to proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6), and interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) [4]. This process is usually accompanied by an increase in reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress.

Therefore, many efforts to treat and prevent the progress of AD have focused in the use of anti-inflammatory and antioxidant compounds. In this scenario, studies on organoselenium compounds have demonstrated both antioxidant and anti-inflammatory properties. Carbohydrate derivatives have emerged as a class of compounds for potential studies, due to its chemical similarity to naturally occurring molecules. Regarding the selenofuranoside compound, a simple carbohydrate that contains a single Se molecule, Vargas et al. [5] demonstrated its effectiveness in restoring  $\delta$ -ALA-D enzyme activity in the ovaries of mice exposed to cadmium. Furthermore, Wollenhaupt et al. [6] recently demonstrated that seleno and telluroxylofuranosides protected against toxicity induced by manganese over the nematode *Caenorhabditis elegans*, leading to nuclear translocation of the transcription factor DAF-16/FOXO, regulating the worms' response to stress, aging, and metabolism. Also, other organoselenium compounds have demonstrated to possess the ability to restore memory loss and cognition impairment induced by A $\beta$  or streptozotocin intracerebroventricular injection [7, 8].

Thus, the aim of this study is to evaluate selenofuranoside, a synthetic organoselenium compound, in a model of Alzheimer-like sporadic dementia induced by intracerebroventricular injection of A $\beta_{25-35}$  in mice, with reference to its possible antioxidant and anti-inflammatory effects and the ability to improve memory loss and impaired cognition.

## 2. Material and Methods

**2.1. Chemicals.** Glutathione reductase,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced tetrasodium salt (NADPH), 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), reduced glutathione (GSH), glutathione disulfide (GSSG), and amyloid-beta peptide (fragment 25–35) (A $\beta_{25-35}$ ) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) was purchased from Aldrich Chemical Co. (USA). Selenofuranoside (Se) was synthesized according to Braga et al. [9] (Figure 1).

The A $\beta$  peptide was dissolved in sterile filtered water and it was aggregated by incubation at 37°C for 4 days before use. Selenofuranoside was dissolved in canola oil.

**2.2. Animals and Treatments.** Adult male Swiss albino mice (25–30 g) were used for this experiment. The animals were kept in an appropriate cabinet for animals with forced air ventilation, in a 12-hour light/dark cycle, at a controlled room temperature of 22°C, with food (Puro Trato, RS, Brazil) and water *ad libitum*. The animals were used according to

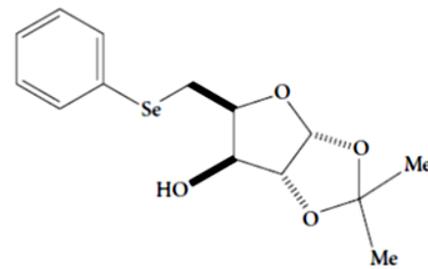


FIGURE 1: Selenofuranoside structure.

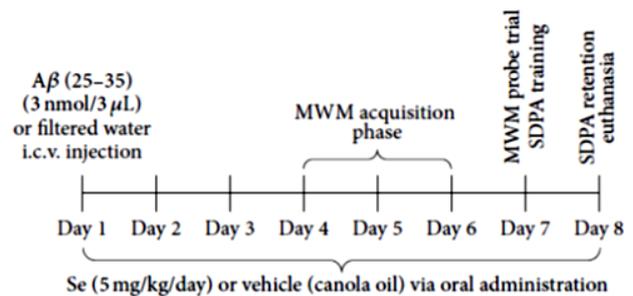


FIGURE 2: Experimental procedure.

the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources (Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil) and all efforts were made to reduce the number of animals being used and their suffering. This study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals of the Federal University of Pampa (Protocol n° 012/2013).

Animals were equally separated into four groups ( $n = 10$ ): control (I); A $\beta$  (II); Se (III); A $\beta$  + Se (IV). Groups III and IV received the Se compound (5 mg/kg/day) orally (intra-gastric gavage) and groups I and II received vehicle (canola oil) every day, until the end of all behavioral tests (Figure 2).

On the first day of treatment, thirty minutes after Se administration, the mice from groups II and IV received a single administration of A $\beta$  peptide (fragments 25–35) in its aggregated form (3 nmol/3  $\mu$ L, i.c.v.). Groups I and III received filtered water (3  $\mu$ L/per site i.c.v.). The dosage of A $\beta$  was based on Wang et al. [10]. Intracerebroventricular injection of the A $\beta$  peptide or vehicle (filtered water) was performed using a stereotaxic (Insight Equipamentos, Brazil) with the bregma fissure as a reference point [11].

Four days after the A $\beta$  peptide (fragments 25–35) injection, the animals have been submitted to behavioral tests. On the eighth day, mice were euthanized and their brains were removed. The whole brains were homogenized in Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) and centrifuged. The supernatant (S1) was used for biochemical analysis.

### 2.3. Behavioral Tests

**2.3.1. Morris Water Maze (MWM).** Spatial learning and memory were accessed using the MWM task according to Morris [12]. The water maze consisted of a round container (180 cm  $\times$  40 cm) made of black plastic and filled with water

( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) at a height of 30 cm. The pool was placed in a room with several visual cues for orientation in the maze. The escape platform was made of the same material and color as the pool and it was placed in the middle of the northwest quadrant, 1 cm below water level. For the acquisition phase, mice were placed next to the wall, facing successively the north, south, east, and west positions. The latency to reach the platform was measured in four trial sessions during 3 consecutive days (corresponding to days 5–7 of treatment) and the animals were allowed to stay in the platform for at least 40 seconds after each trial. Whenever the mice failed to reach the escape platform within 1 min cutoff time, they were retrieved from the pool and placed on it for 40 seconds. Twenty-four hours after the acquisition phase (8th day of treatment), a probe trial was conducted by removing the platform and placing the mice on the north quadrant. The latency as well as the number of crossings over the former platform and the time spent in each quadrant was measured in a single 1-minute trial. The behaviors were videotaped and the experimenter was kept hidden from the animal's sight, but he was able to follow their swimming trajectories.

**2.3.2. Step-Down Passive-Avoidance Test (SDPA).** Nonspatial memory was measured using the SDPA task according to Sakaguchi et al. [13] with modifications in the electric shock and exposure time. During the training session (7th day of treatment), each animal was placed on the platform. When it stepped down and placed its four paws on the grid floor, an electric shock (0.5 mA) was delivered for 2 seconds. This procedure was repeated until the animal remained 1 min on the platform. The retention test was performed 24 h after the training. Each animal was placed again on the platform and the step-down latency was measured, considering a cutoff time of 5 min.

**2.3.3. Open-Field Test (OPT).** Spontaneous locomotor activity was measured in an open-field test [14] performed on the 8th day of treatment. The floor of the open-field was divided into 9 equal squares. Each animal was placed individually in the center of the arena and the number of segments crossed (4 paws criterion) and rearing was counted in a 4 min session.

## 2.4. Biochemical Analysis

**2.4.1. Superoxide Dismutase (SOD) Activity.** The activity of SOD was determined as described by Misra and Fridovich [15]. This method is based on the ability of SOD to inhibit the autooxidation of adrenaline to adrenochrome. The color reaction is measured at 480 nm. One unit of enzyme (1 IU) is defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of autooxidation of adrenaline to 50% at  $26^\circ\text{C}$ .

**2.4.2. Catalase (CAT) Activity.** The CAT activity was determined spectrophotometrically according to the method of Aebi [16], which involves monitoring the consumption of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the presence of the sample (S1) (20  $\mu\text{L}$ ) at 240 nm. Enzyme activity is expressed in units (1 U decomposes 1  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ /min at pH 7 and  $25^\circ\text{C}$ ).

**2.4.3. Glutathione Peroxidase (GPx) Activity.** GPx activity was analyzed spectrophotometrically by the method of Paglia and Valentine [17]. GPx analysis was made by adding GSH, GR, NADPH, and a peroxide to start the reaction, monitored at 340 nm as NADPH is converted to  $\text{NADP}^+$ .

**2.4.4. Glutathione S-Transferase (GST) Activity.** GST activity was analyzed spectrophotometrically at 340 nm, as described by Habig et al. [18]. The reaction mixture contained an aliquot of the homogenized tissue (S1), buffer sodium phosphate 0.1 M pH 7, GSH (100 mM), and 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (100 mM), which was used as a substrate. Enzyme activity is expressed as nmol of CDNB conjugated/min/mg protein (30).

**2.4.5. Glutathione Reductase (GR).** GR activity in S1 was determined as described by Carlberg and Mannervik [19]. In this assay, GSSG is reduced by GR at the expense of NADPH consumption, which is followed at 340 nm. GR activity is proportional to NADPH decay. The enzymatic activity was expressed as nmol NADPH/min/mg protein.

**2.4.6. Glutathione (GSH).** Briefly, an aliquot of S1 was incubated with o-phthalaldehyde (OPT) for 15 min in room temperature [20]. The reaction product was assessed in 420 nm (with excitation in 350 nm). Values were compared to a GSH calibration curve.

**2.4.7. Reactive Species (RS).** The levels of the reactive species were determined by a spectrofluorimetric method, using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCHF-DA) assay [21]. An aliquot of S1 was incubated with DCHF-DA (1 mM). The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichlorofluorescein was measured for the detection of intracellular RS. The DCF fluorescence intensity emission was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) 30 min after the addition of DCHF-DA to the medium.

**2.4.8. Acetylcholinesterase.** For the assessment of AChE activity, samples of the whole brain were homogenized in 0.25 M sucrose buffer (1/10, w/v) and centrifuged at 2400 g at  $4^\circ\text{C}$  for 15 min. The activity of AChE was carried out according to the method of Ellman et al. [22], using acetylthiocholine as substrate. The activity of AChE was spectrophotometrically measured at 412 nm. The activity of AChE was expressed as nmol AcSCh/hour/mg protein.

**2.4.9. Inflammatory Cytokines.** Interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), and tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) were quantified using ELISA mouse kits for serum and plasma (Sigma-Aldrich, USA).

**2.4.10. Protein Determination.** Protein concentration was measured by the method of Bradford [23], using bovine serum albumin as a standard.

TABLE 1: Effect of selenofuranoside on antioxidant enzymes glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, catalase, and superoxide dismutase in mice exposed to A $\beta$  (25–35) peptide.

Groups (n = 10)	GPx (nmol NADPH/min/mg protein)	GR (nmol conjugated CDNB/min/mg protein)	GST (nmol conjugated CDNB/min/mg protein)	CAT (U/mg protein)	SOD (U/mg protein)
Control	21.38 $\pm$ 1.10	24.90 $\pm$ 2.15	566.6 $\pm$ 26.1	0.628 $\pm$ 0.038	51.86 $\pm$ 2.10
Se	18.78 $\pm$ 1.19	21.96 $\pm$ 1.24	707.4 $\pm$ 64.8	0.548 $\pm$ 0.102	56.36 $\pm$ 2.71
A $\beta$	22.29 $\pm$ 1.45	26.93 $\pm$ 1.66	653.1 $\pm$ 34.6	0.676 $\pm$ 0.063	33.85 $\pm$ 4.31*
Se + A $\beta$	19.26 $\pm$ 1.26	25.56 $\pm$ 2.75	699.7 $\pm$ 47.1	0.721 $\pm$ 0.083	49.11 $\pm$ 1.88

Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M.

\* $p < 0.05$  as compared to the control group.

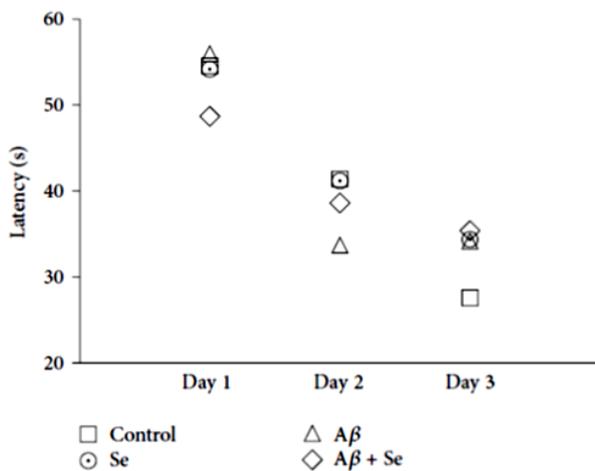


FIGURE 3: Effect of selenofuranoside on the latency (s) to reach the platform in the acquisition phase in mice with amyloid- $\beta$  induced memory deficit in Morris water maze test (n = 10). Data are reported as means.

**2.5. Statistical Analysis.** Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. A statistical analysis was performed using a two-way ANOVA followed by the Tukey's test. The main effects are presented only when the interaction effect was nonsignificant. Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Behavioral Tests

**3.1.1. Water Maze Test.** In the acquisition phase of the WMT, no difference was observed between groups regarding the latency to reach the platform. There was not any type of interaction among treatments or any kind of main effect. However, it is possible to see a significant difference between the days in the acquisition phase in all groups ( $F_{1,36} = 19.40$ ,  $p < 0.001$ ), demonstrating the main effect of time in learning ability (Figure 3).

In the probe test, a significant increase in latency to reach the former platform for the A $\beta$  group compared to the control group was observed (Figure 4(a);  $F_{1,36} = 4.64$ ,  $p < 0.05$ ). Also, it is possible to identify a difference in the total time spent on the quadrant where the platform was located (Figure 4(b)). The A $\beta$  group presented a significant

decrease in this parameter compared to the control group, as well as the Se group. Nevertheless, the Se + A $\beta$  group showed no difference compared to the control group, demonstrating a possible interaction between Se and A $\beta$  ( $F_{1,36} = 18.64$ ,  $p < 0.001$ ).

Two-way ANOVA revealed a significant A $\beta$   $\times$  Se interaction ( $F_{1,36} = 5.113$ ,  $p < 0.05$ ) in the number of crossings over the former platform location (Figure 4(c)). Post hoc comparisons showed that the group that received A $\beta$  via i.c.v. presented a significant decrease in the number of crossings compared to the control group, while Se and Se + A $\beta$  groups showed no difference.

**3.1.2. Step-Down Passive-Avoidance Test.** During the acquisition phase in the passive avoidance, there was no difference in the step-down latency time among groups ( $F_{1,36} = 0.721$ ;  $p < 0.05$ ) (Figure 2). Two-way ANOVA of the step-down latency time in retention trial did not show A $\beta$   $\times$  Se interaction ( $F_{1,36} = 2.185$ ;  $p < 0.05$ ), demonstrating a main effect of A $\beta$  ( $F_{1,36} = 12.420$ ;  $p < 0.01$ ).

Post hoc comparisons showed that the A $\beta$  peptide significantly decreased the step-down latency time in retention trial (Figure 5), while Se partially prevented the alteration caused by A $\beta$ .

**3.1.3. Open-Field Test.** The spontaneous locomotor activity measured in the open-field test did not differ significantly between the groups. Two-way ANOVA for the number of crossings ( $F_{1,36} = 1.084$ ;  $p < 0.05$ ) and rearings ( $F_{1,36} = 0.071$ ;  $p < 0.05$ ) revealed no significant differences (Figure 6).

#### 3.2. Biochemical Analyses

**3.2.1. Oxidative Stress Parameters.** Regarding the antioxidant enzymes, an alteration only in superoxide dismutase was observed. Mice that received the A $\beta$  fragment 25–35 via i.c.v. presented a decrease in SOD activity (65%) in brain samples, which was significantly different from the control group ( $F_{1,36} = 19.72$ ,  $p < 0.001$ ). Selenofuranoside therapy was effective to restore enzyme activity at control levels. All the other antioxidant enzymes assessed in this experiment showed no significant alteration (Table 1).

A main effect of A $\beta$  on GSH levels ( $F_{1,36} = 30.93$ ;  $p < 0.001$ ) was observed in the A $\beta$  group. Increased GSH levels

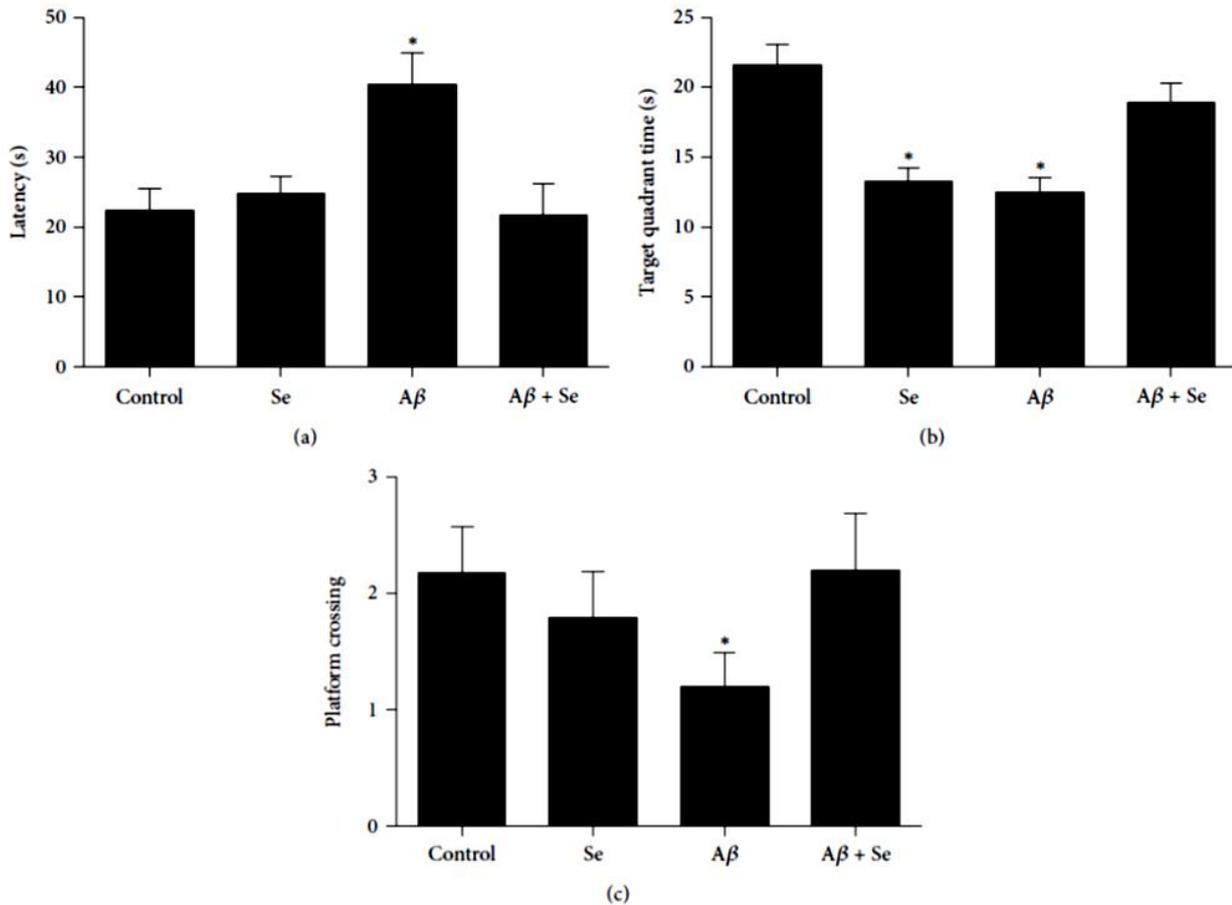


FIGURE 4: Effect of selenofuranoside on amyloid- $\beta$  induced memory deficit in Morris water maze test ( $n = 10$ ). (a) Latency (s) to reach the platform in the probe test (retention phase). (b) Time (s) spent in the former platform quadrant in the probe test. (c) Number of crossings over the former platform position, in the probe test. Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$  as compared to the control group.

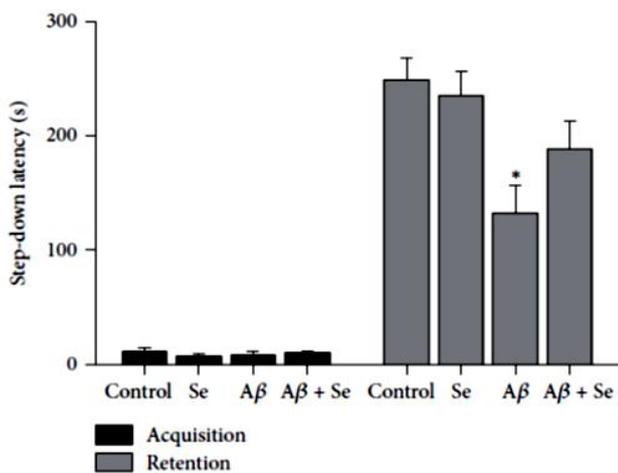


FIGURE 5: Effect of selenofuranoside on the step-down latency (s) in mice with amyloid- $\beta$  induced memory deficit on the passive-avoidance test ( $n = 10$ ). Data are reported as means  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$  as compared to the control group.

were detected in the A $\beta$  group (40%) as well as in the Se + A $\beta$  group (52%) (Figure 7).

Two-way ANOVA demonstrated a significant A $\beta$   $\times$  Se interaction ( $F = 20.92$ ;  $p < 0.001$ ) in RS levels (55%). An increase in this parameter was found in the A $\beta$  group, compared to the control group (Figure 8). Selenofuranoside was able to reduce RS to the control levels, thus demonstrating a possible protective effect of Se.

**3.2.2. AChE Activity.** The A $\beta$  fragment significantly ( $F_{1,36} = 11.30$ ,  $p < 0.01$ ) increased AChE activity (21%) in the whole mice brain compared to the control group. Selenofuranoside therapy was able to prevent this increase (Figure 9).

**3.2.3. Cytokines.** There was a significant A $\beta$   $\times$  Se interaction ( $F_{1,9} = 69.65$ ,  $p < 0.001$ ) in IL-6 cytokine (Figure 10). Post hoc tests showed a significant increase in the Se and A $\beta$  groups compared to control. In the Se + A $\beta$  group, IL-6 levels returned to control levels.

IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  showed no significant difference.

## 4. Discussion

In the present study, we evaluated the effect of an organoselenium compound, selenofuranoside, in a model of Alzheimer-like sporadic dementia induced by intracerebroventricular

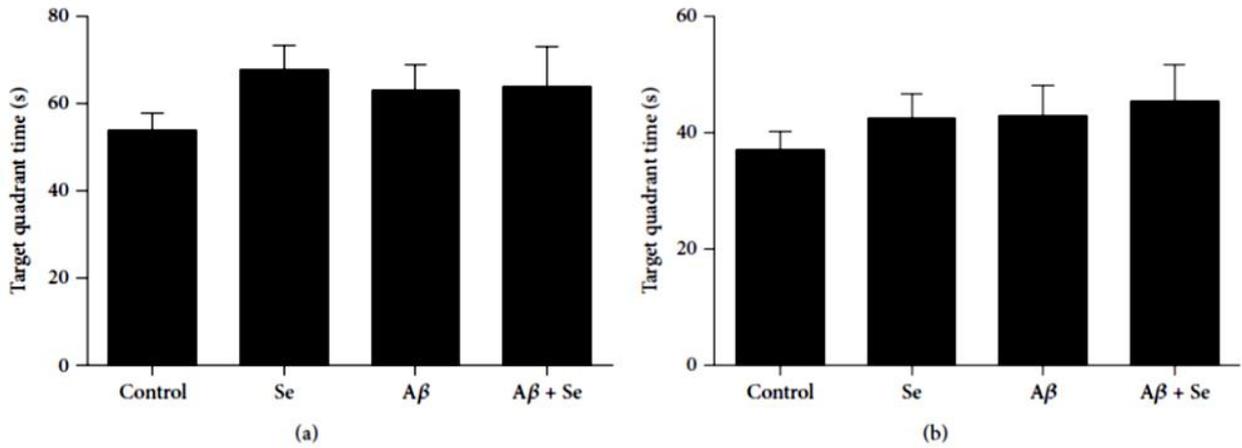


FIGURE 6: Effect of selenofuranoside in mice with memory deficit induced by amyloid- $\beta$  on the open-field test ( $n = 10$ ). (a) Number of crossings and (b) number of rearings. Data are reported as means  $\pm$  S.E.M.

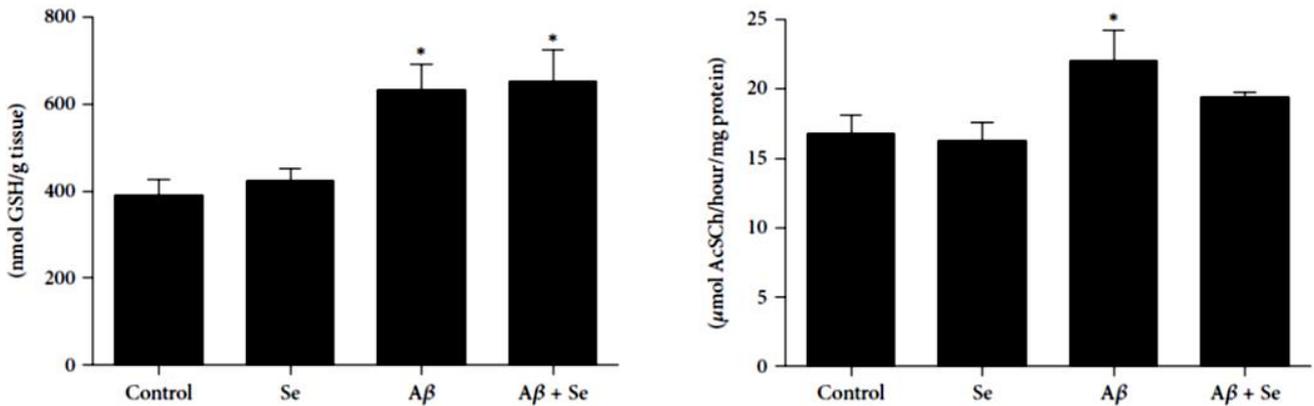


FIGURE 7: Effect of selenofuranoside on glutathione levels in mice brain after amyloid- $\beta$  treatment ( $n = 10$ ). Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. and expressed as nmol of GSH per gram of tissue. \* $p < 0.05$  as compared to the control group.

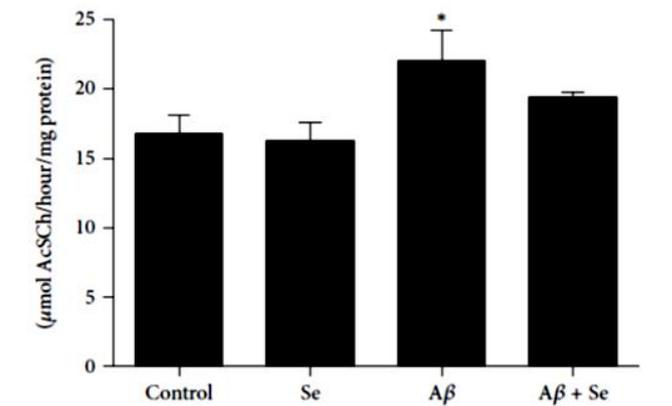


FIGURE 9: Effect of selenofuranoside on acetylcholinesterase activity in mice brain after amyloid- $\beta$  treatment ( $n = 10$ ). Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. and expressed as  $\mu\text{mol AcSCh/hour/mg protein}$ . \* $p < 0.05$  as compared to the control group.

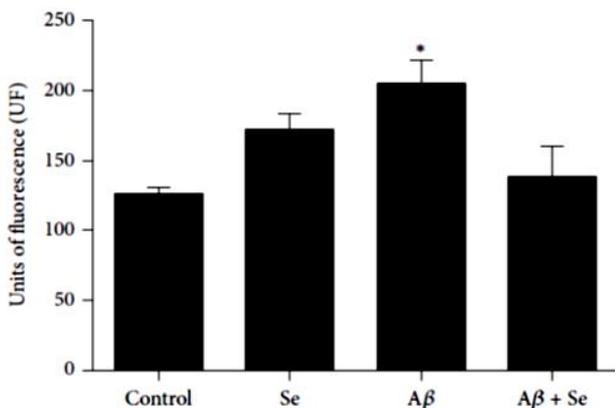


FIGURE 8: Effect of selenofuranoside on reactive species levels in mice brain after amyloid- $\beta$  treatment ( $n = 10$ ). Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. and expressed as UF. \* $p < 0.05$  as compared to the control group.

administration of amyloid-beta peptide fragment (25–35). In order to assign new therapeutic approaches, the synthetic antioxidant compounds, such as organoselenium compounds, have been given more attention due to the fact that these compounds present important biological activities.

According to the results, the A $\beta_{25-35}$  i.c.v. injection caused mild memory impairment as described in other papers [7, 24]. This can be concluded by the increased step-down latency in SDPA test and also by the increased latency to reach the former platform location in the MWM test. The A $\beta_{25-35}$  group also showed a reduction in the number of crossings in the former platform location and also in the time spent in the target quadrant during the MWM test. Selenofuranoside was effective to ameliorate most of these evaluated parameters.

Aiming to provide more information related to cognitive impairment and Se intervention, oxidative stress, inflammatory cytokines, and AChE activity were assessed.

Although the role of oxidative stress and reactive species in AD is not clear, many papers have shown that lipid

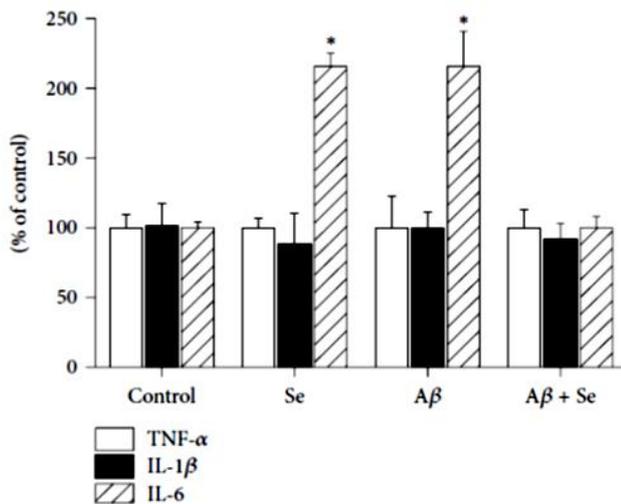


FIGURE 10: Effect of selenofuranoside on cytokines levels in mice brain after amyloid- $\beta$  treatment ( $n = 3$ ). Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. and expressed as relative percentage of control. \*  $p < 0.05$  as compared to the control group.

peroxidation and reactive species are increased in an AD brain compared to brains of healthy persons in the same age range, indicating that these increased factors are not merely a consequence of aging [25]. One theory is that methionine-35 of  $A\beta_{(1-42)}$  is essential for oxidative stress *in vivo* in AD models and presumably in AD brains as well [26]. Even though the  $\alpha$ -helix structure of  $A\beta_{(1-42)}$  is crucial for the production of oxidative stress [27], apparently the C-terminal Met-35 of  $A\beta_{(25-35)}$  fragment also have a strong power to cause mitochondrial dysfunction [28].

The involvement of oxidative stress in memory loss can be seen in our results, since it was possible to see a decrease in SOD activity, one of the most important antioxidant enzymes in most living organisms. This enzyme catalyzes the dismutation of superoxide radical, which is produced as a deleterious byproduct in mitochondrial respiration due to electron leakage. Since mitochondrial dysfunction is regarded as a major causative factor in many neurodegenerative diseases [29], superoxide anion may have accumulated due to the reduction in enzyme activity in the  $A\beta$  group. This may be reflected as an increase in reactive species, also seen in the  $A\beta$  group. It is likely that a reduction in SOD activity is a primordial event in this process that culminates on reactive species accumulation. These, consecutively, could be responsible for the deleterious effects in the brain.

Selenofuranoside may form selenolate radical ( $RSe^{-1}$ ) in a thiol-rich environment, similarly as diphenyl diselenide and ebselen [30]. Selenolate radical can react with  $H_2O_2$  and form selenic acid, which then reacts with thiol group (RSH) to form selenyl sulfide and it can be regenerated back to selenide. This could to some extent explain the reduction in RS levels. However, the most important finding concerning oxidative stress was the ability to restore SOD activity, which probably has most effect on RS levels. Another organoselenium compound, as *p,p'*-methoxyl-diphenyl diselenide, has shown

similar effects on SOD activity in different Alzheimer models [31].

Apart from SOD, we did not find significant alterations in other antioxidant enzymes activities, such as GPx, GR, and CAT, nor in xenobiotic detoxification enzyme GST. However, we detected an increase in GSH levels in the  $A\beta$  group that was not improved by the selenofuranoside treatment. Since not only GSH is responsible for nonenzymatic oxidative stress balance but it is also used for conjugation reactions to eliminate xenobiotics, the increase seen in the  $A\beta$  group may be caused by a response to higher levels of RS or a foreign substance.

Beyond oxidative stress, many studies also indicate an association between inflammation and AD. *In vitro* studies show increased inflammatory cytokines in brain cell cultures submitted to  $A\beta$  and the role of microglial activation in AD [32, 33]. Our results showed a significant difference in IL-6 in the  $A\beta$  and Se groups compared to control. However, no significant differences were detected in other cytokines evaluated, probably due to different animal model used and/or amyloid-beta fragment. Most *in vivo* studies that show the relationship between inflammatory markers and Alzheimer's disease are conducted on rats or transgenic mice.

A possible involvement of IL-6 on memory processes was observed after knockout mice for this particular cytokine exhibit faster learning skills in the radial maze test through 30 days [34], meaning that this cytokine may be somehow involved in spatial memory. Thus, we verified that animals that received amyloid- $\beta$  presented an increase on IL-6 levels and Se therapy protected this parameter. However, Se itself caused an increase on this parameter. We cannot explain the exact reason for this, and other studies need to be carried out for better understanding of this effect. On the other hand, we believe that the main result in this parameter is related to the combination of amyloid- $\beta$  and Se, in which we verified IL-6 levels similar to the control group.

In addition, many researchers are trying to develop new therapies to treat AD. Acetylcholinesterase inhibitors are still largely used, since it has been hypothesized that cognition impairment may be related to a decrease in acetylcholine levels or an increase in AChE activity [35]. We observed an increase in AChE activity after the  $A\beta$  i.c.v. injection, which may explain the results seen in the memory tests employed. Selenofuranoside was able to restore AChE activity as well as memory impairment observed in the  $A\beta$  group.

In conclusion, selenofuranoside could be helpful as a new therapeutic research to manage memory loss and impaired cognition since it can modulate AChE activity and protect against reduced SOD activity and increased RS levels after  $A\beta_{25-35}$  i.c.v. administration. Also, when administered along with  $A\beta$ , selenofuranoside was able to reduce IL-6 concentration to control levels. These effects may be related to the protection against memory loss and cognition impairment presented in behavioral tests. Further studies have to be conducted to evaluate selenofuranoside biological activity as well as its toxicity in order to consider this compound as an alternative therapy for the Alzheimer's disease.

## Conflict of Interests

The authors declare that they have no conflict of interests.

## Acknowledgments

The financial support by CNPq and FAPERGS is gratefully acknowledged. Francielli Weber Santos is the recipient of CNPq fellowship. CAPES is acknowledged for financial support for Doctoral Student fellowship to Aryele Pinto Izaguirry and FAPERGS for MSc fellowship to Natasha Frasson Pavin.

## References

- [1] K. Blennow, M. J. de Leon, and H. Zetterberg, "Alzheimer's disease," *The Lancet*, vol. 368, no. 9533, pp. 387–403, 2006.
- [2] D. J. Selkoe, "Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 31, pp. 18295–18298, 1996.
- [3] M. E. Clementi, S. Marini, M. Coletta, F. Orsini, B. Giardina, and F. Misiti, "A $\beta$ (31-35) and A $\beta$ (25-35) fragments of amyloid beta-protein induce cellular death through apoptotic signals: role of the redox state of methionine-35," *FEBS Letters*, vol. 579, no. 13, pp. 2913–2918, 2005.
- [4] S. T. Ferreira, J. R. Clarke, T. R. Bomfim, and F. G. de Felice, "Inflammation, defective insulin signaling, and neuronal dysfunction in Alzheimer's disease," *Alzheimer's & Dementia*, vol. 10, no. 1, pp. S76–S83, 2014.
- [5] L. M. Vargas, M. B. Soares, A. P. Izaguirry et al., "Cadmium inhibits the ovary  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase activity *in vitro* and *ex vivo*: protective role of seleno-furanoside," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 33, no. 7, pp. 679–684, 2013.
- [6] S. G. N. Wollenhaupt, A. T. Soares, W. G. Salgueiro et al., "Seleno- and telluro-xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 64, pp. 192–199, 2014.
- [7] S. Pinton, A. C. Souza, M. H. M. Sari, R. M. Ramalho, C. M. P. Rodrigues, and C. W. Nogueira, "p,p'-Methoxy-diphenyl diselenide protects against amyloid- $\beta$  induced cytotoxicity *in vitro* and improves memory deficits *in vivo*," *Behavioural Brain Research*, vol. 247, pp. 241–247, 2013.
- [8] S. Pinton, T. B. Sampaio, R. M. Ramalho, C. M. P. Rodrigues, and C. W. Nogueira, "p,p'-Methoxy-diphenyl diselenide prevents neurodegeneration and glial cell activation induced by streptozotocin in rats," *Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 33, no. 1, pp. 133–144, 2013.
- [9] H. C. Braga, H. A. Stefani, M. W. Paixão, F. W. Santos, and D. S. Lüttke, "Synthesis of 5'-seleno-xylofuranosides," *Tetrahedron*, vol. 66, no. 19, pp. 3441–3446, 2010.
- [10] H. H. Wang, C. J. Chou, J. F. Liao, and C. F. Chen, "Dehydroevodiamine attenuates  $\beta$ -amyloid peptide-induced amnesia in mice," *European Journal of Pharmacology*, vol. 413, no. 2-3, pp. 221–225, 2001.
- [11] T. J. Haley and W. G. McCormick, "Pharmacological effects produced by intracerebral injection of drugs in the conscious mouse," *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, vol. 12, no. 1, pp. 12–15, 1957.
- [12] R. Morris, "Developments of a water-maze procedure for studying spatial-learning in the rat," *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 11, no. 1, pp. 47–60, 1984.
- [13] M. Sakaguchi, M. Koseki, M. Wakamatsu, and E. Matsumura, "Effects of systemic administration of beta-casomorphin-5 on learning and memory in mice," *European Journal of Pharmacology*, vol. 530, no. 1-2, pp. 81–87, 2006.
- [14] R. N. Walsh and R. A. Cummins, "The open-field test: a critical review," *Psychological Bulletin*, vol. 83, no. 3, pp. 482–504, 1976.
- [15] H. P. Misra and I. Fridovich, "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 247, no. 10, pp. 3170–3175, 1972.
- [16] H. Aebi, "Catalase *in vitro*," *Methods in Enzymology*, vol. 105, pp. 121–126, 1984.
- [17] D. E. Paglia and W. N. Valentine, "Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase," *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, vol. 70, no. 1, pp. 158–169, 1967.
- [18] W. H. Habig, M. J. Pabst, and W. B. Jakoby, "Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 249, no. 22, pp. 7130–7139, 1974.
- [19] I. Carlberg and B. Mannervik, "Glutathione reductase," *Methods in Enzymology*, vol. 113, pp. 484–490, 1985.
- [20] P. J. Hissin and R. Hilf, "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues," *Analytical Biochemistry*, vol. 74, no. 1, pp. 214–226, 1976.
- [21] Q. Chen, E. J. Vazquez, S. Moghaddas, C. L. Hoppel, and E. J. Lesnefsky, "Production of reactive oxygen species by mitochondria—central role of complex III," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 38, pp. 36027–36031, 2003.
- [22] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres Jr., and R. M. Featherstone, "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity," *Biochemical Pharmacology*, vol. 7, no. 2, pp. 88–90, 1961.
- [23] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248–254, 1976.
- [24] A. Díaz, K. Rojas, B. Espinosa et al., "Aminoguanidine treatment ameliorates inflammatory responses and memory impairment induced by amyloid-beta 25-35 injection in rats," *Neuropeptides*, vol. 48, no. 3, pp. 153–159, 2014.
- [25] X. Wang, W. Wang, L. Li, G. Perry, H. G. Lee, and X. Zhu, "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular Basis of Disease*, vol. 1842, no. 8, pp. 1240–1247, 2014.
- [26] A. M. Swomley, S. Förster, J. T. Keeney et al., "A $\beta$ , oxidative stress in Alzheimer disease: evidence based on proteomics studies," *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis of Disease*, vol. 1842, no. 8, pp. 1248–1257, 2014.
- [27] J. Kanski, M. Aksenova, C. Schöneich, and D. A. Butterfield, "Substitution of isoleucine-31 by helical-breaking proline abolishes oxidative stress and neurotoxic properties of Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 32, no. 11, pp. 1205–1211, 2002.
- [28] S. Varadarajan, J. Kanski, M. Aksenova, C. Lauderback, and D. A. Butterfield, "Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's A $\beta$ (1–42) and A $\beta$ (25–35)," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 123, no. 24, pp. 5625–5631, 2001.
- [29] M. H. Yana, X. Wang, and X. Zhu, "Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 62, pp. 90–101, 2013.

- [30] W. Hassan, M. Ibrahim, and J. B. T. Rocha, "Towards the mechanism and comparative effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen under various pathophysiological conditions in rat's kidney preparation," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 182, no. 1, pp. 52–58, 2009.
- [31] S. Pinton, J. T. da Rocha, B. M. Gai, M. Prigol, L. V. da Rosa, and C. W. Nogueira, "Neuroprotector effect of *p, p'*-methoxyl-diphenyl diselenide in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type in mice: contribution of antioxidant mechanism," *Cell Biochemistry and Function*, vol. 29, no. 3, pp. 235–243, 2011.
- [32] H. G. Kim, M. Moon, J. G. Choi et al., "Donepezil inhibits the amyloid-beta oligomer-induced microglial activation *in vitro* and *in vivo*," *NeuroToxicology*, vol. 40, pp. 23–32, 2014.
- [33] K. Bhaskar, N. Maphis, G. Xu et al., "Microglial derived tumor necrosis factor- $\alpha$  drives Alzheimer's disease-related neuronal cell cycle events," *Neurobiology of Disease*, vol. 62, pp. 273–285, 2014.
- [34] D. Braidà, P. Sacerdote, A. E. Panerai et al., "Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice," *Behavioural Brain Research*, vol. 153, no. 2, pp. 423–429, 2004.
- [35] M. Singh, M. Kaur, H. Kukreja, R. Chugh, O. Silakari, and D. Singh, "Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 70, pp. 165–188, 2013.

## **Selenofuranoside reduces A $\beta$ (1-16) deposition and GFAP production but does not improve memory impairment in APP/PS1 transgenic mice**

Cristiano Chiapinotto Spiazzi, Stijn Stroobants, Rudi D'Hooge, Francielli Weber Santos

### **ABSTRACT**

World population is increasingly older, and neurodegenerative diseases that are correlated with aging, such as Alzheimer's disease (AD), are starting to become more common. Recent efforts are aimed to find a way to retard AD progress. Substances with antioxidant and anti-inflammatory properties, such as organoselenium compounds, are being studied as retardants of neurodegenerative damage. The aim of this study was to evaluate the effect of selenofuranoside, a synthetic organoselenium compound, in an Alzheimer-like sporadic dementia animal model. Three-month old male and female wild-type (WT) mice (C57BL/6J) and APP/PS1 transgenic (TG) mice were used for this experiment. Selenofuranoside (10 mg/kg, SE) or vehicle (canola oil, VEH) was administered via oral either to WT or TG mice twice a week, for 5 month-period. A battery of behavioural tests including Morris water maze (MWM), Y-Maze, elevated plus-maze (EPM), Social Preference/Social Novelty test (SPSN), were performed to assess memory and anxiety. Also, Rotarod and 23h cage activity tests were performed to eliminate motor impairment. Histochemical analysis was done in coronal brain sections to evaluate  $\beta$ -amyloid 1-16 (A $\beta$ <sub>1-16</sub>) deposits, GFAP production and amyloid plaques. No alterations were seen in Rotarod or at the cage activity tests. Both TG and WT mice performed alike at Y-maze, EPM and SPSN tests. At MWM acquisition phase, only a main effect of genotype was observed at day 9 for path length and latency to find the platform, where TG mice presented an increase in both parameters. A main effect was also observed at the time spent in each quadrant during the second probe of MWM. Whereas WT mice seemed to spent more time in the target quadrant searching for the platform, TG mice practically did not differentiate the quadrants, showing no significant difference spent at them. SE treatment was not effective to protect against memory loss shown at the MWM. Even though, SE treatment significantly decreased GFAP production and A $\beta$ <sub>1-16</sub> deposits at TG mice, compared to VEH, this improvement was not reflected at the behavioural tests. Nonetheless, the fact that selenofuranoside was able to reduce A $\beta$ <sub>1-16</sub> deposits in APP/PS1 mice is promising for further studies.

Key-words: Alzheimer's Disease; selenofuranoside; organoselenium; transgenic mice.

## INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia, mainly related to aging (Blennow, de Leon et al. 2006). Nowadays, there are around 46.8 million people that present some sort of dementia worldwide (Prince, Wimo et al. 2015), and it is believed that this number might double every 20 years (Prince, Bryce et al. 2013). This disease is characterized by its progressive and slow deterioration in cognition, memory, functional ability, behavior and mood.

There are several theories for AD pathology, such as the presence of neurofibrillary tangles, inflammation processes and neuronal degeneration. Nevertheless, one of the most accepted theories is the amyloidogenic theory, which suggests the formation of amyloid plaques as the major cause for AD. These plaques are formed by a dense core of aggregated amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) peptide. This peptide is formed by proteolytic process of amyloid precursor protein (APP) by the action of  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase, and may vary between 39 and 43 amino acid residues (Selkoe 1996).

Transgenic animal models were developed to study this theory. One of the most widely used models is the APP/PS1 transgenic mice, which presents a higher rate of  $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ . Also, these animals present neuronal loss, amyloid plaque deposition, neuroinflammation, cognitive impairment and behavioral alterations (McGowan, Eriksen et al. 2006, Van Dam and De Deyn 2006), making this an ideal model to study the effect of new compounds on amyloidogenic theory.

In this scenario, studies on organoselenium compounds have demonstrated both antioxidant and anti-inflammatory properties. Also, these compounds have demonstrated the ability to restore memory loss induced by  $A\beta$  or streptozotocin intracerebroventricular injection (Pinton, Sampaio et al. 2013, Pinton, Souza et al. 2013, Spiazzi, Soares et al. 2015). Selenofuranoside, a synthetic organoselenium compound used in this study, have also demonstrated a beneficial effect in mice injected with  $A\beta$  fragment 25-35, being able to protect against memory loss and oxidative stress parameters (Spiazzi, Soares et al. 2015).

Thus, the aim of this study is to evaluate selenofuranoside in APP/PS1 transgenic mice model of Alzheimer-like sporadic dementia, concerning its possible ability to protect against memory loss.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Chemicals**

Selenofuranoside (Se) was synthesized according to Braga, Stefani et al. (2013). Canola oil was bought from local market. All other reagent were analytical grade.

### **Animals and treatment**

The APP/PS1 mouse model was provided and licensed by Dr Mathias Jucker (Hertie Institute for Clinical Brain Research, Tübingen, Germany) and Dr Bart De Strooper (Laboratory for the Research of Neurodegenerative Diseases, University of Leuven, Belgium). Heterozygous male APP/PS1 mice from the Tübingen colony were crossbred at the Leuven animal facilities with female C57BL/6J mice from Elevage Janvier (Le-Genest-St-Isle, France). Offspring were genotyped using PCR on DNA isolated from tail biopsy as previously described (Radde, Bolmont et al. 2006). For behavioral testing, we used both male and female APP/PS1 transgenic mice (TG) and wild type mice (WT) kept in standard animal cages under conventional laboratory conditions (12 h light/dark cycle, 22 °C), and ad libitum access to food and water.

Three-month old TG and WT mice received either selenofuranoside (10 mg/kg, SE) or vehicle (canola oil, VEH) twice a week for 5 month period, when the behavioral tests started. Mice continued receiving the treatment during the tests.

Experiments were conducted during the light phase of the activity cycle. All protocols have been reviewed and approved by the animal ethics committee of the University of Leuven. The APP/PS1 mouse model has been shown to develop AD neuropathology at 2 months of age, whereas behavioral impairments occur from 8 months of age onwards (Radde, Bolmont et al. 2006).

### **Rotarod**

Motor coordination and equilibrium was tested on an accelerating rotarod (Med Associates, St. Albans, VT). Mice were first trained at constant speed (4 rpm, 2 min) before they started with four test trials (intertrial interval, 10 min). During these test trials, the animals had to balance on a rotating rod that accelerated from 4 to 40 rpm in 5 min, and time until they dropped from the rod was recorded (up to the 5 min cutoff).

### **23h cage activity**

Cage activity was recorded using a lab-build activity logger connected to three infrared (IR) photo beams. Mice were put separately in 20 x 30 cm<sup>2</sup> transparent cages, placed between the photo beams, and activity was expressed as beam crossings for each 30 min, during a 23 hour interval.

### **Y-maze**

Working memory was assessed in a Y-shaped maze (Naert, Callaerts-Vegh et al. 2011). The maze consisted of 3 arms (5 cm wide, 30 cm long and enclosed by 30 cm high wall made of grey plastic) connected by a central small area (diameter 5 cm). Mice were placed in the centre for 10 min exploration of all arms. Locomotion was recorded by a webcam connected to a screen. Entries into all arms were noted (4 paws had to be inside the arm for a valid entry) and an alternation was counted if an animal entered three different arms consecutively. Percentage spontaneous alternation (%SA) was calculated according to following formula:  $[(\text{number of alternations})/(\text{total number of arm entries} - 2)] \times 100$  (Sarter, Bodewitz et al. 1988, Hiramatsu, Sasaki et al. 1997).

### **Social recognition**

A social novelty and recognition task was adapted from Nadler, Moy et al. (2004), and described in detail elsewhere (Naert, Callaerts-Vegh et al. 2011). Briefly, the setup consisted of three compartments divided by transparent Plexiglas walls with guillotine doors. A round holding cage (diameter 12 cm) was placed in each of the two outer compartments. The procedure consisted of three consecutive phases, between the phases the mouse was contained in the middle compartment. During the first phase (acclimation phase), mice were habituated to the apparatus for 5 min. In a second phase (sociability phase), an unfamiliar male mouse (S1) was introduced in one holding cage on one side while the other remained empty (-). Exploratory behavior (exploring and sniffing) towards S1 and the empty cage was recorded for 10 min. In the third phase (social recognition phase), a second unfamiliar mouse (S2) was placed

in the formerly empty holding cage. Exploratory behavior towards both S1 and S2 was measured for 10 min. Exploratory behavior was defined as sniffing time towards the cage (nose oriented towards cage at a distance  $\geq 2$  cm). We calculated preference ratio (RatioPref) as  $\text{TimeS1} / (\text{TimeS1} + \text{Timeempty})$ , and recognition ratio (RatioRec) as  $\text{TimeS2} / (\text{TimeS1} + \text{TimeS2})$ . The position of S1 and S2 was counterbalanced between animals, and the apparatus was cleaned thoroughly with water after each trial.

### **Morris water maze**

Spatial learning abilities were tested in a standard hidden platform acquisition and memory retention version of the Morris water maze (Goddyn, Leo et al. 2006). The water maze consisted of a large circular pool (diameter 150 cm) filled with water opacified with nontoxic white paint ( $26 \pm 0.5$  °C) and mice were trained for 10 days (two blocks of 5 days with two days of rest in between) to find the circular escape platform (diameter 15 cm) that was hidden 1 cm beneath the water surface. Four trials starting from four different starting positions were performed each day with a trial interval of 30 min. When mice failed to find the platform within 2 min, they were gently guided to the platform and were left there for 15 s, before being returned to their cages. Latency to find the hidden platform, distance moved and swimming velocity were recorded with Ethovision (Noldus Bv, Wageningen, The Netherlands).

To evaluate retention memory, probe trials were performed on days 6 and 11. During these probe trials, the platform was removed, and the swimming path was recorded during 100 s. Time spent in each quadrant was measured, as well as latency and number of crossing.

### **Immunohistochemistry**

After behavioral testing, mice were killed by cervical dislocation, and removed brain was fixed and stored in 4% paraformaldehyde in PBS pH 7.4. A $\beta$  immunohistochemistry was performed as described previously (Ding, Qiao et al. 2008). Coronal brain sections, 60  $\mu\text{m}$ -thick were cut using a vibratome and were put in a 24-wells plate, free-floating in PBS buffer. The sections were boiled 3 times in 10 mM citrate buffer (pH 6). They were first incubated for 60 min in blocking buffer [5% (v/v) normal goat serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA,

USA) in PBS containing 0.2% (v/v) Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)]. Subsequently, sections were incubated with primary monoclonal mouse anti-A $\beta$  (1-16) antibodies overnight at 4 °C (6E10; BioLegend, San Diego, CA, USA; 1:150), and afterwashes by PBS, incubated with anti-mouse biotinylated secondary antibody (90 min at RT, Santa Cruz Biotechnology). The samples were incubated again with blocking buffer, and subsequently with primary polyclonal rabbit anti-GFAP antibodies (Dako, Germany, 1:200) for 90 min at 4°C. Samples were PBS washed and incubated with anti-rabbit biotinylated secondary antibody (90 min at RT, Santa Cruz Biotechnology). A $\beta$  plaques and GFAP were counted in hippocampus and presented as number of plaques per highly magnified field. Four highly magnified fields were counted per animal.

In addition, amyloid plaques were histochemically visualized as described previously (Batelli et al., 2008). Briefly, brain samples were incubated in fresh filtered 0.05% Thioflavin S (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in PBS for 8 min at RT. The number of thioflavin-positive plaques per high magnified field was counted in hippocampus and prefrontal cortex using an Axioskop fluorescence microscope (Carl Zeiss GmbH, Hamburg, Germany). Four high magnified fields were counted per animal and averaged. ImageJ was used to determine threshold and area of fluorescent images.

### **Statistical Analysis**

Data are expressed as means $\pm$ SEM and analyzed with SPSS version 20. Differences between mean values in Morris water maze acquisition trials and 23 hours activity test were analyzed with repeated measures (RM) analysis of variance (ANOVA). One-way ANOVA was used to measure differences in other behavioral tests. Student t-tests was used to determine differences in immunohistochemical analysis. Differences of  $p < 0.05$  were considered significant.

## **RESULTS**

### **Rotarod**

Rotarod test was performed to evaluate motor skills and exclude mice that showed any kind of impairment, due to the need of motor abilities in other behavioural tests. No difference was noted regarding genotype or treatment (Figure 1). However, a main

effect was seen on gender, suggesting that female mice stayed longer on the rod than male mice ( $F_{1,51} = 6.461$ ;  $p = 0.015$ ).

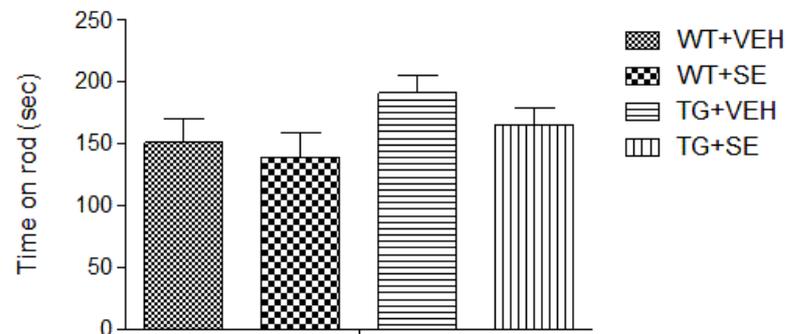


Figure 1. Time, in seconds, spent at the rod during Rotarod test of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). Data is presented as mean $\pm$ SEM.

### 23 hours cage activity

Cage active was performed to evaluate if genotype or treatment are affecting mice circadian cycle. The first peak shown is the exploratory behavior in response to a new environment. Since mice are nocturnal animals, two distinct peaks are seen at 22h and again at 2h30min. Although a slight decrease can be observed at TG mice around the second peak, no significant difference was observed regarding genotype  $\times$  time or treatment  $\times$  time (Figure 2).

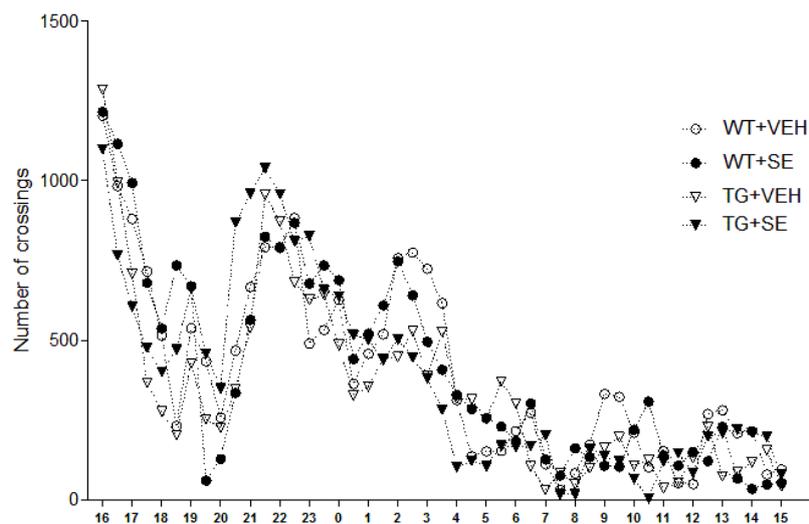


Figure 2. Number of sensor beam crossings during 23 hours cage activity test of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). Data is presented as mean $\pm$ SEM.

## Y-Maze

Y-Maze Spontaneous Alternation is a behavioral test for measuring the willingness of rodents to explore new environments. Rodents typically prefer to investigate a new arm of the maze rather than returning to one that was previously visited, indicating the status of reference and working memory. No difference was observed in total arm entries (Figure 3A) nor in percentage of arm alternation (Figure 3B).

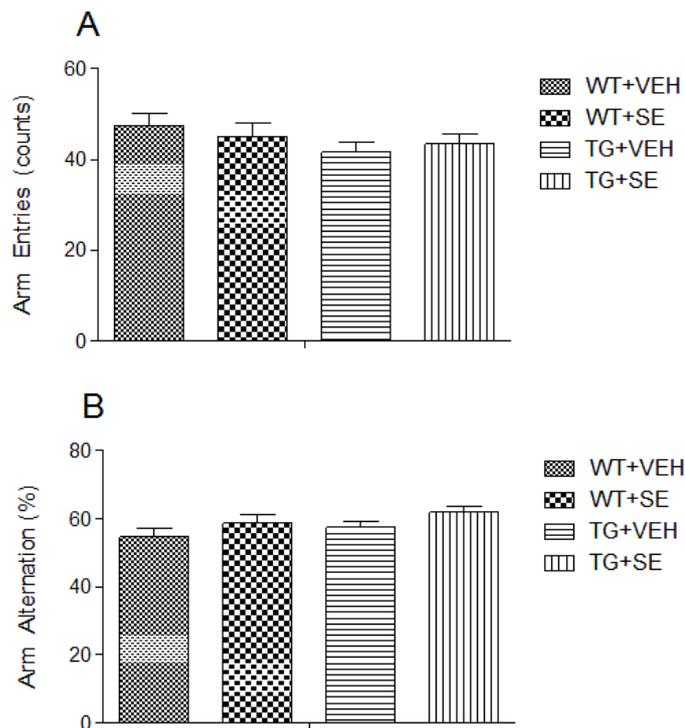


Figure 3. (A) Total number of arm entries during 10 minutes and (B) Percentage of spontaneous arm alternations during 10 minutes at Y-Maze test of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). Data is presented as mean $\pm$ SEM.

## Social preference/Social novelty

During social preference trial (Figure 5A), mice showed a similar preference for contact with an unfamiliar stranger mouse (S1) compared to an empty cage. No difference in genotype or treatment was observed. Throughout social novelty trial (Figure 5B), mice showed a slight increase in exploration time of new stranger mouse (S2) in comparison with the previous one (S1), however the increase in exploration was not significant, neither the differences between genotype or treatment.

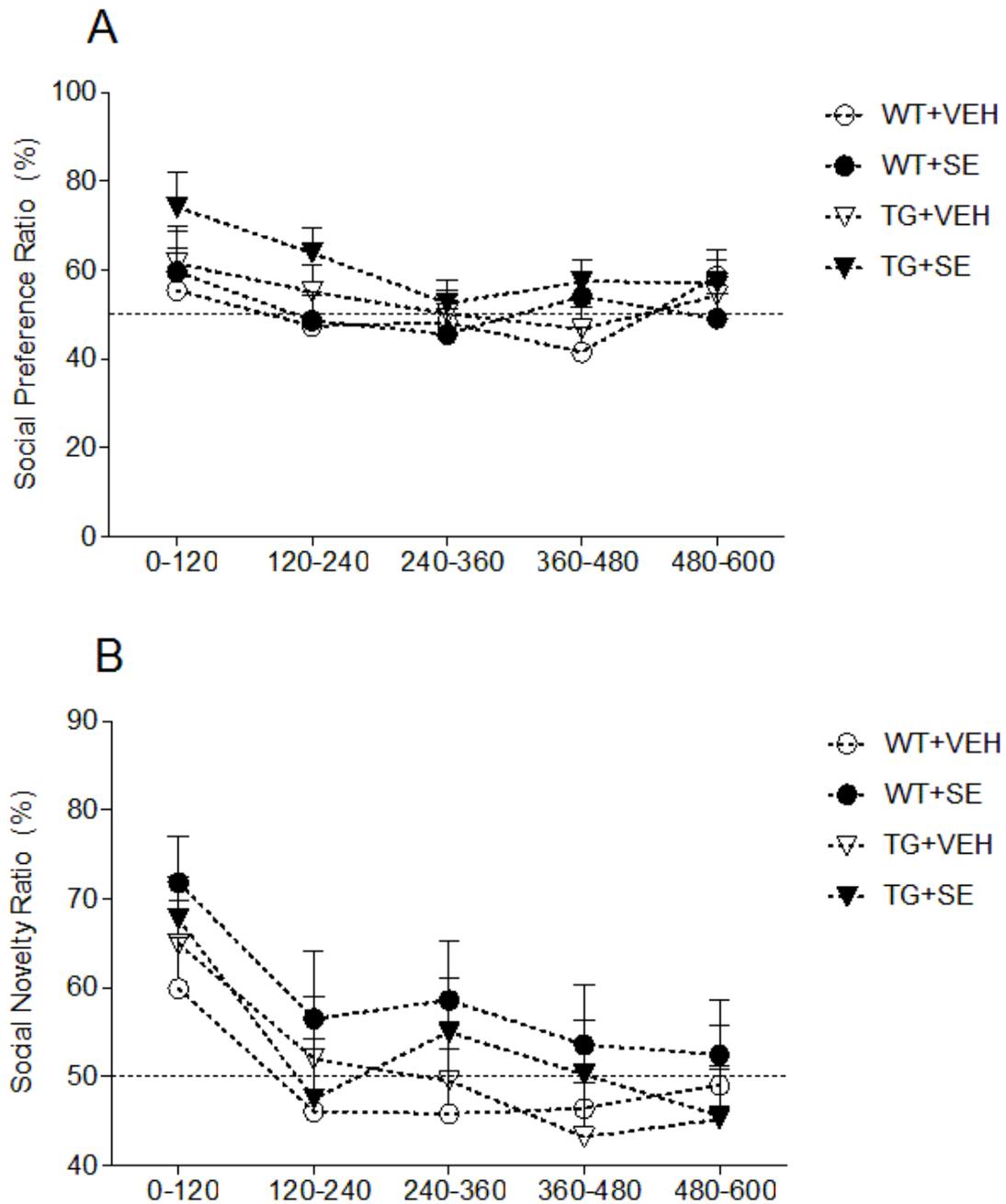


Figure 4. (A) Percentage of time ratio spent at S1 side during social preference divided in 2 min intervals and (B) Percentage of time ratio spent at S2 side during social novelty divided in 2 min intervals at SPSN test of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). Data is presented as mean $\pm$ SEM.

### Morris Water Maze

Mice spatial memory was evaluated at the Morris water maze test. During the training sessions, some mice presented a floating behavior, which was increasingly higher

throughout the days. Six mice that presented a floating rate higher than 20% were excluded from statistical analysis for every experiment.

During acquisition phase of MWM, escape latency (Figure 5A) and path length (Figure 5B) to find the platform were recorded. A main effect of genotype was observed for escape latency during day 7 ( $F_{1,51} = 4.168$ ,  $p = 0.047$ ), day 9 ( $F_{1,51} = 8.146$ ,  $p = 0.007$ ) and day 10 ( $F_{1,51} = 4.346$ ,  $p = 0.043$ ). A main effect of genotype was also seen in the path length during day 7 ( $F_{1,51} = 5.667$ ,  $p = 0.022$ ), day 9 ( $F_{1,51} = 13.936$ ,  $p = 0.001$ ) and day 10 ( $F_{1,51} = 4.670$ ,  $p = 0.036$ ). These results suggest a cognitive deficit for TG mice, since the animals spent more time and wandered through a longer path to find the platform. No significant effect of treatment or interaction were observed.

During the probe tests, no differentiation between time spent on quadrants was noticed during the first probe (Figure 6), however a clear main effect of genotype can be seen at the second probe test. The main effect was observed for the time spent at target quadrant (TQ), where WT spent around 34% more time than TG mice ( $F_{1,51} = 8.871$ ,  $p = 0.005$ ), and also at opposite quadrant (Opp), in which TG spent 42% more time than WT animals ( $F_{1,51} = 6.994$ ,  $p = 0.011$ ). No effect of treatment or interactions were observed for time spent in each quadrant.

Also, during the probe tests a slight increase was observed at latency time to reach the platform position for TG+VEH group in both probe tests, however Tukey post-hoc analysis showed no significant differences between groups. A small decrease was also seen for number of crossings at platform location in both probe tests for the same group, but again no significant difference was detected between groups.

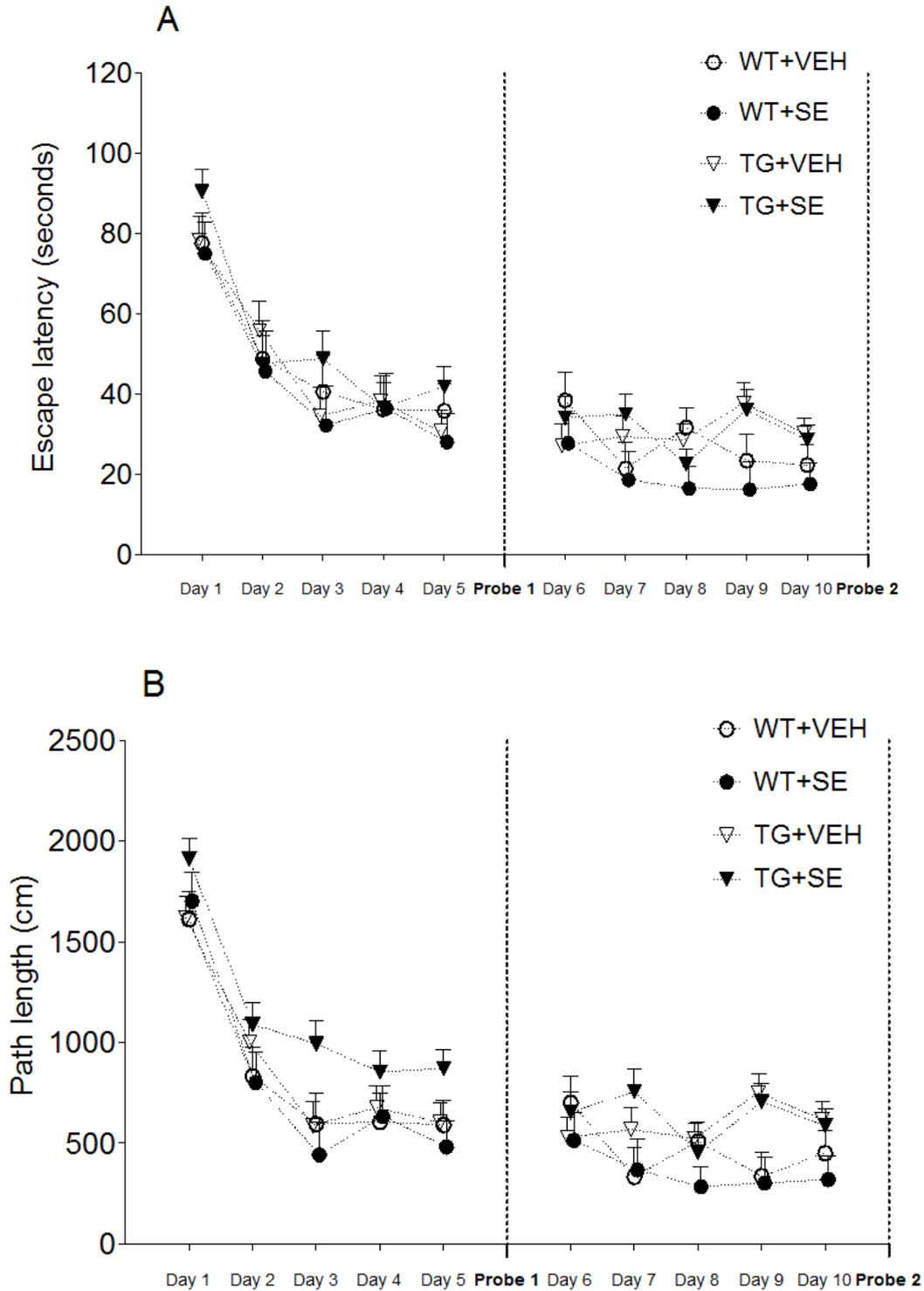


Figure 5. (A) Escape latency and (B) Path Length to reach the platform during acquisition phase at Morris Water Maze of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). Data is presented as mean $\pm$ SEM.

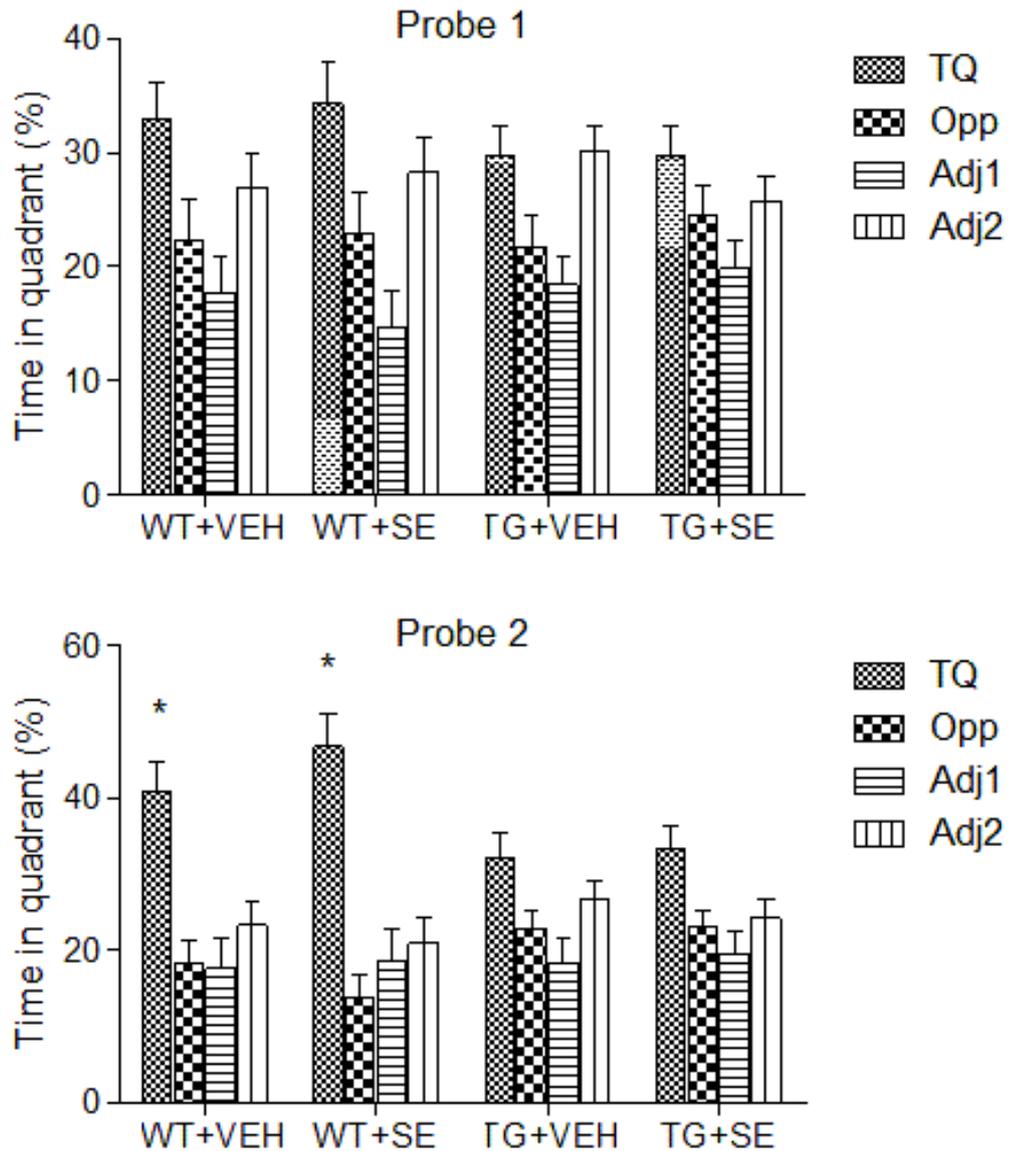


Figure 6. Time, in seconds, spent in each pool quadrant during probe phase at Morris Water Maze of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). TQ = Target quadrant; Opp = Opposite quadrant; Adj1 = Adjacent quadrant 1; Adj2 = Adjacent quadrant 2. Data is presented as mean $\pm$ SEM

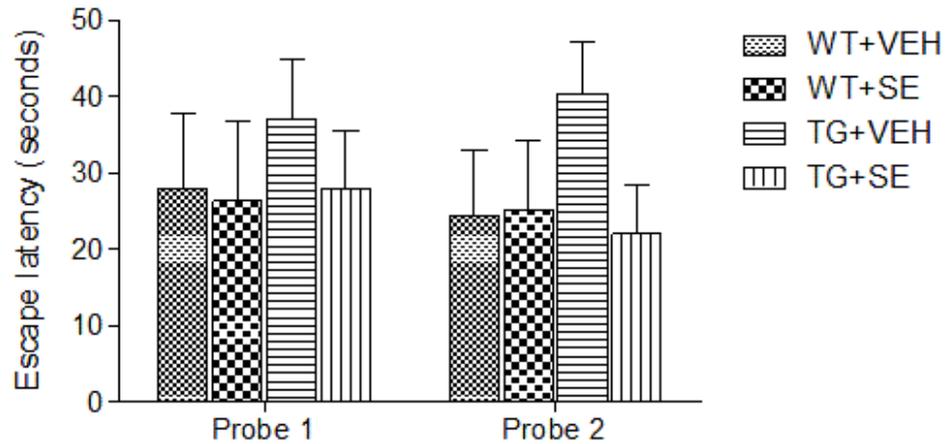


Figure 7. Escape latency to reach the platform during probe tests at Morris Water Maze of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). Data is presented as mean $\pm$ SEM

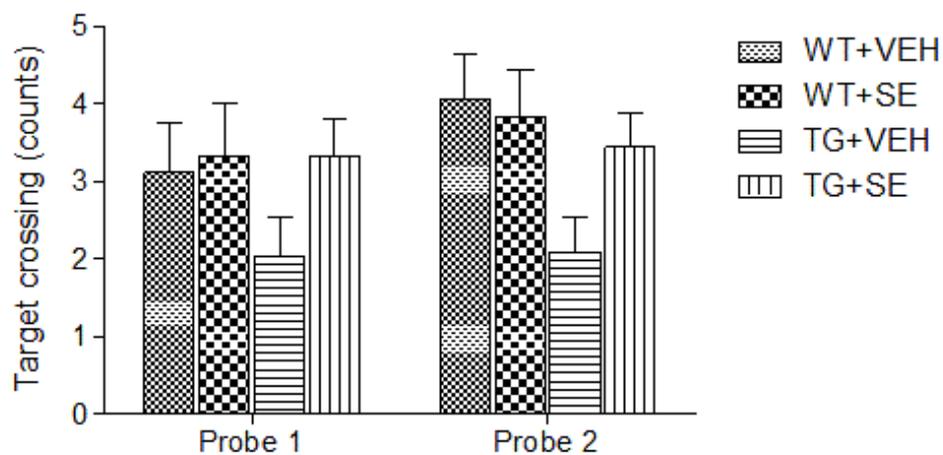


Figure 8. Number of crossing at the absent platform location during probe tests at Morris Water Maze of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). Data is presented as mean $\pm$ SEM

### Elevated plus-maze

Elevated plus-maze was performed to assess anxiety on mice. Total number of beam crosses (Figure 9A), percentage of open arm entries (Figure 9B) and time spent on open arms (Figure 9C) were recorded during 10 min of the test. No significant difference was observed for genotype, treatment or interaction.

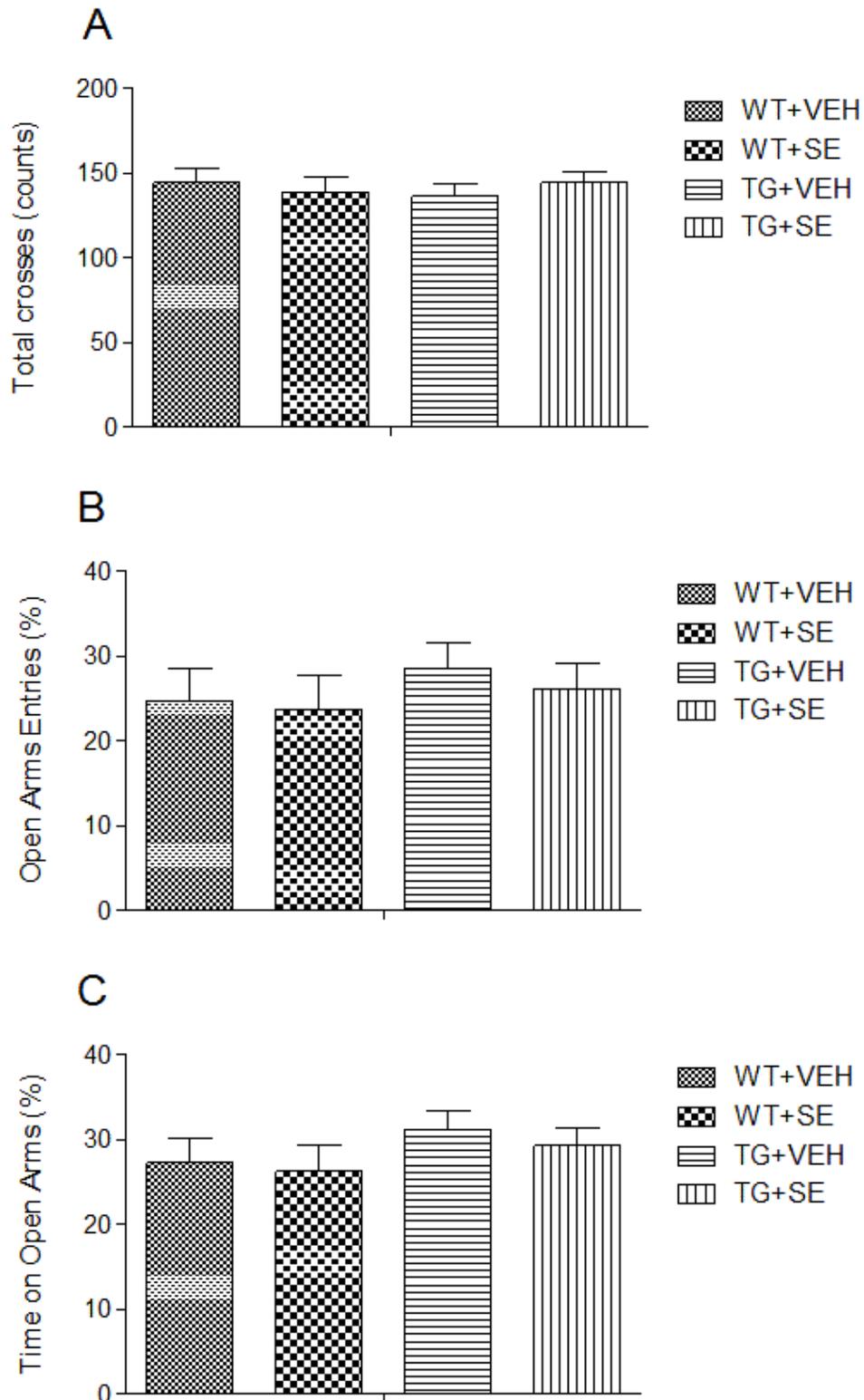


Figure 9. (A) Total number of beam crosses, (B) Percentage of open arm entries and (C) Time spent on open arms during 10 min at the Elevated Plus Maze (EPM) of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). Data is presented as mean  $\pm$  SEM

## Histochemistry

Coronal brain slices of TG animals were evaluated regarding GFAP and A $\beta$  (6E10) concentrations through immunostaining and amyloid plaque deposition by thioflavin-S staining. Fluorescent images for each staining, as well as the merged image, can be seen in Figure 10. WT mice images were included as reference.

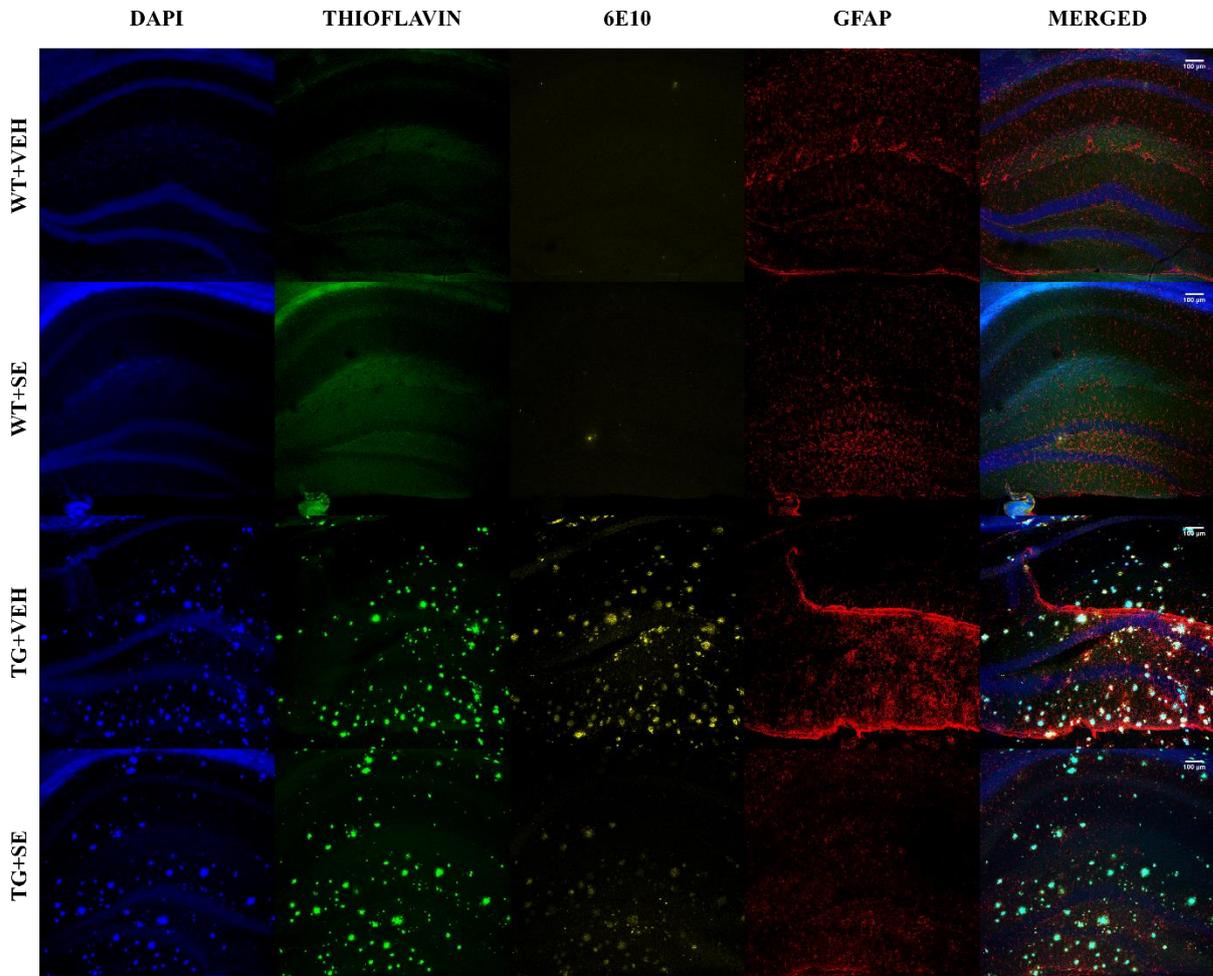


Figure 10. Coronal brain slices stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Thioflavin-S, primary monoclonal mouse anti-A $\beta$  (1-16) antibodies (6E10) and primary polyclonal rabbit anti-GFAP antibodies (GFAP) of Wild-Type (WT) and APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE).

Concentration of GFAP, A $\beta$  and plaque deposition are shown in Figure 11, and it is represented as mean percentage of total fluorescent area at coronal slices. SE treated animals presented a significant decrease at GFAP concentration, around 69%, showed by two-tailed student T-test ( $F_{1,25} = 8.121$ ,  $p = 0.002$ ). A similar effect was observed at A $\beta$  (6E10) concentration, in which SE treated animals presented a significant decrease of 60% ( $F_{1,25} = 6.540$ ,  $p = 0.004$ ).

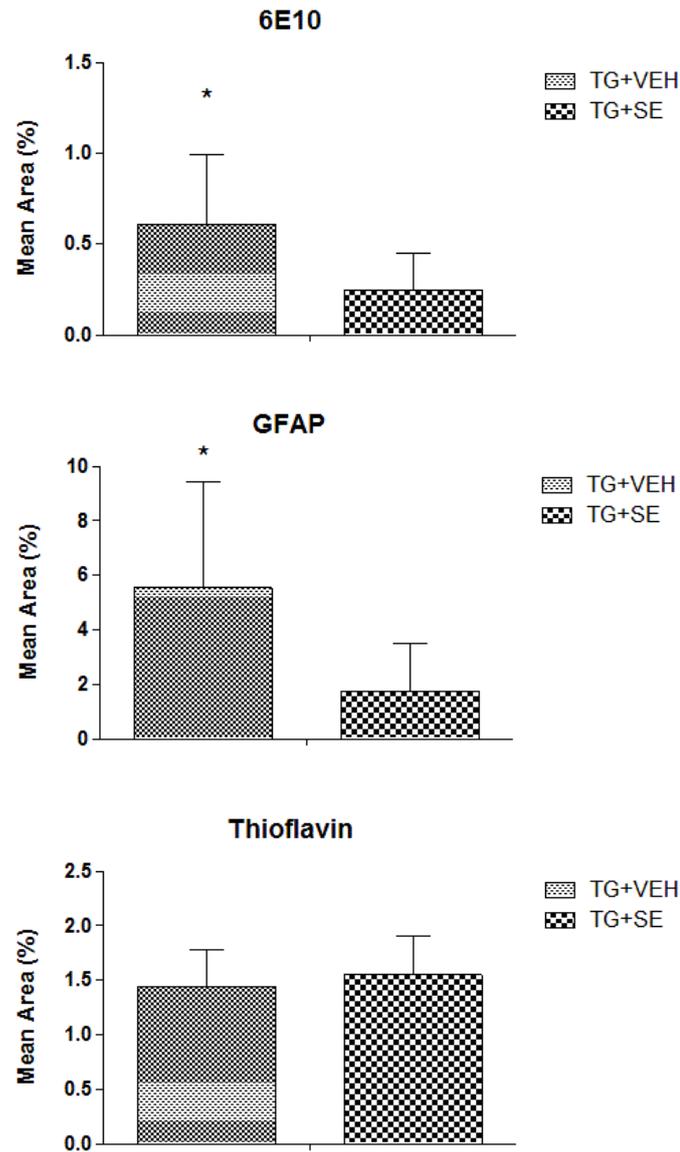


Figure 11. Percentage of total high magnification area of coronal brain slices stained by primary monoclonal mouse anti-A $\beta$  (1-16) antibodies (6E10), primary polyclonal rabbit anti-GFAP antibodies (GFAP) and Thioflavin-S of APP/PS1 transgenic (TG) mice that received either vehicle (canola oil, VEH) or selenofuranoside (SE). Data is presented as mean $\pm$ SEM. \*  $p < 0.01$

## DISCUSSION

In this paper, we analyzed the effect of an organic selenium compound, selenofuranoside, on APP/PS1 transgenic mice model for Alzheimer-like disease. No alterations were perceived on Y-Maze, SPSN and EPM tests. A main effect of genotype was observed at the time spent on target quadrant during the second probe of MWM, suggesting memory impairment at TG mice. However, no effect of treatment was observed at behavioural tests.

Immunohistochemical analysis was also performed at coronal section of brain samples for GFAP, A $\beta$  (6E10 probe) and amyloid plaques through thioflavin-S staining. A significant decrease was observed at GFAP and A $\beta$  (6E10) concentrations.

Astrogliosis is most often evidenced by increased GFAP expression (Eng, Ghirnikar et al. 2000) and is associated with the increased production of factors that may either be beneficial or harmful to surrounding cells (Pekny, Wilhelmsson et al. 2014). In addition, factors produced by astrocytes together with microglial derived cytokines play a role in the immune response of the brain (Wang and Bordey 2008). Neuronal loss, one of the primary causes of AD resulting from A $\beta$ -induced inflammatory response, is closely related to astrocyte activation (White, Manelli et al. 2005, Morales, Farias et al. 2010). In this sense, the observed decrease in astrocyte activation marker (GFAP) in transgenic animals treated with selenofuranoside may play a role in avoiding neuronal death.

In addition, a significant decrease in A $\beta$  was also observed in coronal brain section through primary monoclonal mouse anti-A $\beta$  (1-16) antibodies (6E10) immunostaining. However, this was not reflected in a reduction of amyloid plaques, and consequently no effect of treatment was observed at behavioural tests.

6E10 antibody recognises an epitope in the N-terminal region of both A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42. The 6E10 N-terminal epitope is also recognised in A $\beta$  (1-16/17), a fragment that could reflect catabolism of A $\beta$  (Hernandez-Guillamon, Mawhirt et al. 2015, Moore, Evans et al. 2015), or additional processing of the C99 carboxy terminal membrane bound fragment following  $\beta$ -cleavage (Portelius, Mattsson et al. 2011). Either way, its reduction by selenofuranoside did not affect amyloid plaque formation.

Nonetheless, the fact that selenofuranoside was able to reduce GFAP and A $\beta$  concentrations in APP/PS1 transgenic mice over a 5-month treatment period is promising for future studies.

### **Conflict of Interests**

The authors declare that they have no conflict of interests.

### **Acknowledgments**

CAPES is acknowledged for financial support for Doctoral Student fellowship for Cristiano Chiapinotto Spiazzi.

### **References**

- Blennow, K., M. J. de Leon and H. Zetterberg (2006). "Alzheimer's disease." *Lancet* 368(9533): 387-403.
- Braga, H. C., H. A. Stefani, M. W. Paixão, F. W. Santos and D. S. Lüdtkke (2013). Synthesis of 5'-seleno-xylofuranosides. *Tetrahedron*. 66: 3441-3446.
- Ding, Y., A. Qiao, Z. Wang, J. S. Goodwin, E. S. Lee, M. L. Block, M. Allsbrook, M. P. McDonald and G. H. Fan (2008). "Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model." *J Neurosci* 28(45): 11622-11634.
- Eng, L. F., R. S. Ghirnikar and Y. L. Lee (2000). "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)." *Neurochem Res* 25(9-10): 1439-1451.
- Goddyn, H., S. Leo, T. Meert and R. D'Hooge (2006). "Differences in behavioural test battery performance between mice with hippocampal and cerebellar lesions." *Behav Brain Res* 173(1): 138-147.
- Hernandez-Guillamon, M., S. Mawhirt, S. Blais, J. Montaner, T. A. Neubert, A. Rostagno and J. Ghiso (2015). "Sequential Amyloid-beta Degradation by the Matrix Metalloproteases MMP-2 and MMP-9." *J Biol Chem* 290(24): 15078-15091.
- Hiramatsu, M., M. Sasaki, T. Nabeshima and T. Kameyama (1997). "Effects of dynorphin A (1-13) on carbon monoxide-induced delayed amnesia in mice." *Pharmacol Biochem Behav* 56(1): 73-79.
- McGowan, E., J. Eriksen and M. Hutton (2006). "A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice." *Trends Genet* 22(5): 281-289.
- Moore, S., L. D. Evans, T. Andersson, E. Portelius, J. Smith, T. B. Dias, N. Saurat, A. McGlade, P. Kirwan, K. Blennow, J. Hardy, H. Zetterberg and F. J. Livesey (2015). "APP metabolism regulates tau proteostasis in human cerebral cortex neurons." *Cell Rep* 11(5): 689-696.
- Morales, I., G. Farias and R. B. Maccioni (2010). "Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease." *Neuroimmunomodulation* 17(3): 202-204.

Nadler, J. J., S. S. Moy, G. Dold, D. Trang, N. Simmons, A. Perez, N. B. Young, R. P. Barbaro, J. Piven, T. R. Magnuson and J. N. Crawley (2004). "Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice." *Genes Brain Behav* 3(5): 303-314.

Naert, A., Z. Callaerts-Vegh and R. D'Hooge (2011). "Nocturnal hyperactivity, increased social novelty preference and delayed extinction of fear responses in post-weaning socially isolated mice." *Brain Res Bull* 85(6): 354-362.

Naert, A., Z. Callaerts-Vegh, D. Moechars, T. Meert and R. D'Hooge (2011). "Vglut2 haploinsufficiency enhances behavioral sensitivity to MK-801 and amphetamine in mice." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35(5): 1316-1321.

Pekny, M., U. Wilhelmsson and M. Pekna (2014). "The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis." *Neurosci Lett* 565: 30-38.

Pinton, S., T. B. Sampaio, R. M. Ramalho, C. M. Rodrigues and C. W. Nogueira (2013). "p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide prevents neurodegeneration and glial cell activation induced by streptozotocin in rats." *J Alzheimers Dis* 33(1): 133-144.

Pinton, S., A. C. Souza, M. H. Sari, R. M. Ramalho, C. M. Rodrigues and C. W. Nogueira (2013). "p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide protects against amyloid-beta induced cytotoxicity in vitro and improves memory deficits in vivo." *Behav Brain Res* 247: 241-247.

Portelius, E., N. Mattsson, U. Andreasson, K. Blennow and H. Zetterberg (2011). "Novel abeta isoforms in Alzheimer's disease - their role in diagnosis and treatment." *Curr Pharm Des* 17(25): 2594-2602.

Prince, M., R. Bryce, E. Albanese, A. Wimo, W. Ribeiro and C. P. Ferri (2013). "The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis." *Alzheimers Dement* 9(1): 63-75 e62.

Prince, M., A. Wimo, M. Guerchet, G.-C. Ali, Y.-T. Wu and M. Prina (2015). *World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends*. London.

Radde, R., T. Bolmont, S. A. Kaeser, J. Coomaraswamy, D. Lindau, L. Stoltze, M. E. Calhoun, F. Jaggi, H. Wolburg, S. Gengler, C. Haass, B. Ghetti, C. Czech, C. Holscher, P. M. Mathews and M. Jucker (2006). "Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology." *EMBO Rep* 7(9): 940-946.

Sarter, M., G. Bodewitz and D. N. Stephens (1988). "Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines." *Psychopharmacology (Berl)* 94(4): 491-495.

Selkoe, D. J. (1996). "Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease." *J Biol Chem* 271(31): 18295-18298.

Spiazzi, C. C., M. B. Soares, A. P. Izaguirry, L. M. Vargas, M. M. Zanchi, N. Frasson Pavin, R. Ferreira Affeldt, D. L. Seibert, M. Prigol and F. W. Santos (2015). "Selenofuranoside Ameliorates Memory Loss in Alzheimer-Like Sporadic Dementia:

AChE Activity, Oxidative Stress, and Inflammation Involvement." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2015: 9.

Van Dam, D. and P. P. De Deyn (2006). "Drug discovery in dementia: the role of rodent models." *Nat Rev Drug Discov* 5(11): 956-970.

Wang, D. D. and A. Bordey (2008). "The astrocyte odyssey." *Prog Neurobiol* 86(4): 342-367.

White, J. A., A. M. Manelli, K. H. Holmberg, L. J. Van Eldik and M. J. Ladu (2005). "Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation." *Neurobiol Dis* 18(3): 459-465.

## 5. DISCUSSÃO

Na presente tese, um composto orgânico de selênio, o selenofuranosídeo, foi utilizado em dois modelos animais para Doença de Alzheimer, sendo um por administração intracerebroventricular (i.c.v.) do fragmento  $A\beta_{25-35}$  em camundongos Swiss albino e o outro com camundongos transgênicos APP/PS1.

No primeiro experimento, foi observado que a administração i.c.v. da  $A\beta_{25-35}$  causou prejuízo moderado na memória, como verificado em outros estudos (Pinton, Souza et al. 2013, Diaz, Rojas et al. 2014). Isso pode ser concluído pela observação na redução da latência de descida da plataforma no teste de esQUIVA passiva, e também pelo aumento na latência para encontrar o local da plataforma no labirinto aquático de Morris (MWM) durante o teste sem plataforma. O grupo  $A\beta_{25-35}$  também mostrou uma redução no número de cruzamentos no local da plataforma, bem como no tempo gasto no quadrante alvo. O composto foi capaz de proteger contra o déficit de memória observado nesses testes comportamentais.

No modelo utilizando camundongos transgênicos APP/PS1, também foi observado alterações no tempo de permanência no quadrante alvo durante o segundo teste sem a plataforma no MWM. Os animais transgênicos (TG) mostraram uma redução no tempo de permanência nesse quadrante em relação aos animais selvagens (WT), indicando um déficit de aprendizagem. Entretanto, diferentemente do modelo utilizando o fragmento  $A\beta_{25-35}$ , não foi observado efeito do composto utilizado nesse teste comportamental.

Em outros testes comportamentais realizados em camundongos TG, não foi observada diferenças em comparação com animais WT. Isso dificultou a observação de efeitos do composto utilizado, já que os camundongos não expressaram o fenótipo esperado. Isso pode ser devido à variabilidade individual, visto que o desvio padrão observado nos parâmetros medidos é bastante pronunciado, apesar do tamanho da amostra utilizado. Esse problema poderia ser contornado em trabalhos futuros através de um aumento do tamanho amostral, para aumentar o poder da estatística.

Posteriormente, para melhor entender o mecanismo relacionado ao detrimento no aprendizado e a intervenção com selenofuranosídeo durante o primeiro experimento, avaliou-se parâmetros do estresse oxidativo, citocinas inflamatórias e a atividade da acetilcolinesterase (AChE). No segundo experimento, foi feita análise imuno-histoquímica em fatias coronais de cérebro dos camundongos TG para avaliar

a produção da proteína GFAP, presença de fragmentos A $\beta$  e depósitos de placas amiloides.

O envolvimento do estresse oxidativo pode ser observado através do decréscimo na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), uma das principais enzimas antioxidantes na maioria dos seres vivos, e isso reflete no aumento de EROs. É importante ressaltar que a disfunção mitocondrial tem um papel importante na neurodegeneração (Yan, Wang et al. 2013), causando escape de elétron na respiração celular e formação de radicais livres.

Embora o papel do estresse oxidativo na patogênese da DA ainda não esteja completamente elucidado, sabe-se que a peroxidação lipídica e espécies reativas encontram-se aumentadas em cérebro de pacientes em comparação com pessoas saudáveis na mesma faixa etária (Wang, Wang et al. 2014). Uma das teorias é que a metionina na posição 35 da A $\beta$  tenha envolvimento na propagação do estresse oxidativo, uma vez que ela pode sofrer oxidação, formando radical sulfanil e levando a peroxidação lipídica (Varadarajan, Kanski et al. 2001, Butterfield and Sultana 2011, Swomley, Forster et al. 2014).

A fração seleneto do selenofuranosídeo pode formar o radical selenolato (RSe<sup>-1</sup>) em soluções ricas em tióis, de forma semelhante ao disseleneto de difenila e ebselen (Hassan, Ibrahim et al. 2009). Esse por sua vez reage com peróxidos e forma ácido selênico, que então reage com tióis formando selenil sulfeto e pode ser regenerado a seleneto novamente. Esse processo é semelhante ao que a glutathiona (GSH) sofre nas células, desta forma, o selenofuranosídeo pode ter auxiliado na redução de espécies reativas agindo de forma semelhante à GSH. Também se observou um aumento nos níveis de GSH, que pode ser tanto uma resposta ao aumento dos níveis de espécies reativas, como à presença de substâncias estranhas, pois essa é usada também para eliminação de xenobióticos através de conjugação.

Além dos parâmetros de estresse oxidativo, também se observou o envolvimento de citocinas inflamatórias. Sabe-se que o aumento dessas está relacionado à DA, e tem um papel na ativação da micróglia (Bhaskar, Maphis et al. 2014, Kim, Moon et al. 2014). Notou-se uma diferença nos níveis de IL-6 tanto nos animais injetados com A $\beta$  quanto aos que receberam somente o composto. Essa interleucina pode estar envolvida com a memória espacial, visto que camundongos *knockout* para essa citocina demonstraram um melhor aprendizado em teste de

labirinto radial (Braidá, Sacerdote et al. 2004), sugerindo que níveis elevados dessa possam ser deletérios à memória.

A astrogliose é geralmente evidenciada por um aumento na expressão de GFAP (Eng, Ghirnikar et al. 2000) e está associado com o aumento de fatores que podem ser tanto prejudiciais quanto benéficos às células vizinhas (Pekny, Wilhelmsson et al. 2014). Esses fatores, em conjunto com citocinas derivadas da micróglia, como a observada no primeiro experimento, tem um papel importante na resposta imune do cérebro (Wang and Bordey 2008). A perda neuronal é uma das principais consequências da resposta inflamatória induzida pela produção de A $\beta$ , e está fortemente relacionada com a ativação dos astrócitos (White, Manelli et al. 2005, Morales, Farias et al. 2010).

No segundo experimento foi observado uma redução na produção de GFAP em camundongos TG tratados com o composto, o que poderia indicar uma redução na ativação da micróglia. Desta forma, a redução observada nesse marcador pode ter um papel importante em evitar a morte neuronal, e poderia ser um dos motivos pela redução observado na IL-6 durante o primeiro experimento.

Ainda, foi observado um aumento na atividade da AChE no grupo de animais injetados com A $\beta$ . Tanto um aumento na atividade dessa enzima, como uma redução nos níveis de acetilcolina podem estar envolvidos com o declínio cognitivo (Singh, Kaur et al. 2013). Visto que o selenofuranosídeo foi capaz de modular a atividade da AChE, acredita-se que isso tenha um papel importante na recuperação do desempenho observado nos testes comportamentais.

Além disso, a análise imuno-histoquímica também mostrou um decréscimo significativo na concentração de A $\beta$  em secções coronais do cérebro de camundongos TG tratados. O anticorpo utilizado, 6E10, reconhece o epítipo na região N-terminal de ambas A $\beta$ 40 e A $\beta$ 42. O epítipo N-terminal também é reconhecido nos peptídeos A $\beta$  (1-16/17), fragmentos que podem indicar catabolismo da A $\beta$  (Hernandez-Guillamon, Mawhirt et al. 2015, Moore, Evans et al. 2015) ou processamento adicional da porção carboxi-terminal do fragmento C99 por  $\beta$ -clivagem (Portelius, Mattsson et al. 2011). Isso sugere que o selenofuranosídeo pode estar alterando a produção de A $\beta$  ou o interferindo com o catabolismo da mesma.

Entretanto, a redução observada no peptídeo A $\beta$  não foi refletida na concentração de depósitos das placas amiloides, e conseqüentemente nenhum efeito do tratamento foi observado nos testes comportamentais. Ainda assim, o efeito

observado para esse composto mostra um potencial promissor para prevenção na evolução da doença.

Porém mais estudos devem ser realizados a fim de elucidar a interação do composto selenofuranosídeo com A $\beta$ , bem como avaliação das propriedades anti-inflamatória e antioxidante. Outra propriedade interessante para estudos futuros é a capacidade de modular a atividade da enzima AChE, visto que a maioria dos fármacos indicados para paciente com DA são inibidores seletivos dessa enzima.

## 6. CONCLUSÃO

O composto orgânico de selênio utilizado nesse trabalho, o selenofuranosídeo, foi capaz de proteger contra perda de memória e cognição em camundongos injetados com fragmento 25-35 do peptídeo  $\beta$ -amiloide ( $A\beta_{25-35}$ ), provavelmente através da modulação da atividade da AChE. O composto também foi capaz de proteger contra a redução da atividade da SOD, reduzindo os níveis de espécies reativas nesses animais. Também foi verificado um envolvimento da interleucina-6 (IL-6), que foi observada aumentada nos grupos SE e  $A\beta$ , porém o grupo  $A\beta$ +SE apresentou níveis iguais aos do controle.

Além disso, o composto foi capaz de reduzir a produção da proteína acídica fibrilar glial (GFAP) e os níveis de  $A\beta$  em camundongos transgênicos APP/PS1. Entretanto, não foi verificada diferenças significativas nos depósitos de placas amiloides e déficit de memória apresentado pelos animais transgênicos no teste do labirinto aquático de Morris.

Portanto, o selenofuranosídeo parece ter efeito benéfico parcial visualizado em ambos modelos, indicando um potencial promissor para futuros estudos.

## 7. REFERENCIAS

Agostinho, P., R. A. Cunha and C. Oliveira (2010). "Neuroinflammation, oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease." Curr Pharm Des **16**(25): 2766-2778.

Akiyama, H., S. Barger, S. Barnum, B. Bradt, J. Bauer, G. M. Cole, N. R. Cooper, P. Eikelenboom, M. Emmerling, B. L. Fiebich, C. E. Finch, S. Frautschy, W. S. T. Griffin, H. Hampel, M. Hull, G. Landreth, L.-F. Lue, R. Mrak, I. R. Mackenzie, P. L. McGeer, M. K. O'Banion, J. Pachter, G. Pasinetti, C. Plata-Salaman, J. Rogers, R. Rydel, Y. Shen, W. Streit, R. Strohmeyer, I. Tooyoma, F. L. Van Muiswinkel, R. Veerhuis, D. Walker, S. Webster, B. Wegrzyniak, G. Wenk and T. Wyss-Coray (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. Neurobiology of Aging. **21**: 383-421.

ALZFORUM, I. C. o. A. s. P. s. D. (2015). "Biogen Antibody Buoyed by Phase 1 Data and Hungry Investors." Retrieved 21 de fevereiro, 2017, from <http://www.alzforum.org/print-series/413246>.

Alzheimer's Association, A. (2016). "2016 Alzheimer's disease facts and figures." Alzheimers Dement **12**(4): 459-509.

Alzheimer's Association, A. (2017). "Alzheimer's Disease : Stages of Alzheimer's." Retrieved 17 de fevereiro, 2017, from [http://www.alz.org/alzheimers\\_disease\\_stages\\_of\\_alzheimers.asp](http://www.alz.org/alzheimers_disease_stages_of_alzheimers.asp).

Anand, P. and B. Singh (2013). "A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease." Arch Pharm Res **36**(4): 375-399.

Andreyev, A. Y., Y. E. Kushnareva and A. A. Starkov (2005). "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species." Biochemistry (Mosc) **70**(2): 200-214.

Associação Brasileira de Alzheimer, A. (2017). "Sobre Alzheimer : O que é Alzheimer." from <http://www.abraz.org.br/sobre-alzheimer/o-que-e-alzheimer>.

Bains, J. S. and C. A. Shaw (1997). "Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death." Brain Res Brain Res Rev **25**(3): 335-358.

Barnes, D. E. and K. Yaffe (2005). "Vitamin E and donepezil for the treatment of mild cognitive impairment." N Engl J Med **353**(9): 951-952; author reply 951-952.

Barnham, K. J., W. J. McKinstry, G. Multhaup, D. Galatis, C. J. Morton, C. C. Curtain, N. A. Williamson, A. R. White, M. G. Hinds, R. S. Norton, K. Beyreuther, C. L. Masters, M. W. Parker and R. Cappai (2003). "Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis." J Biol Chem **278**(19): 17401-17407.

Bhaskar, K., N. Maphis, G. Xu, N. H. Varvel, O. N. Kokiko-Cochran, J. P. Weick, S. M. Staugaitis, A. Cardona, R. M. Ransohoff, K. Herrup and B. T. Lamb (2014). "Microglial derived tumor necrosis factor-alpha drives Alzheimer's disease-related neuronal cell cycle events." Neurobiol Dis **62**: 273-285.

Billingsley, M. L. and R. L. Kincaid (1997). "Regulated phosphorylation and dephosphorylation of tau protein: effects on microtubule interaction, intracellular trafficking and neurodegeneration." Biochem J **323 ( Pt 3)**: 577-591.

Blennow, K., M. J. de Leon and H. Zetterberg (2006). "Alzheimer's disease." Lancet **368**(9533): 387-403.

Blennow, K., M. Leon and H. Zetterberg (2006). Alzheimer's disease. Lancet. **368**: 387-403.

Bourdel-Marchasson, I., M. C. Delmas-Beauvieux, E. Peuchant, S. Richard-Harston, A. Decamps, B. Reignier, J. P. Emeriau and M. Rainfray (2001). "Antioxidant defences and oxidative stress markers in erythrocytes and plasma from normally nourished elderly Alzheimer patients." Age Ageing **30**(3): 235-241.

Boyd, R. (2011). "Selenium stories." Nat Chem **3**(7): 570.

Braak, H., E. Braak and M. Strothjohann (1994). "Abnormally phosphorylated tau protein related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads in the cerebral cortex of sheep and goat." Neurosci Lett **171**(1-2): 1-4.

Braga, H. C., H. A. Stefani, M. W. Paixão, F. W. Santos and D. S. Lüdtkke (2010). "Synthesis of 5'-seleno-xylofuranosides." Tetrahedron **66**(19): 3441-3446.

Braga, H. C., H. A. Stefani, M. W. Paixão, F. W. Santos and D. S. Lüdtkke (2013). Synthesis of 5'-seleno-xylofuranosides. Tetrahedron. **66**: 3441-3446.

Braida, D., P. Sacerdote, A. E. Panerai, M. Bianchi, A. M. Aloisi, S. Iosue and M. Sala (2004). "Cognitive function in young and adult IL (interleukin)-6 deficient mice." Behav Brain Res **153**(2): 423-429.

Bugel, S., E. H. Larsen, J. J. Sloth, K. Flytlie, K. Overvad, L. C. Steenberg and S. Moesgaard (2008). "Absorption, excretion, and retention of selenium from a high selenium yeast in men with a high intake of selenium." Food Nutr Res **52**.

Burk, R. F., B. K. Norsworthy, K. E. Hill, A. K. Motley and D. W. Byrne (2006). "Effects of chemical form of selenium on plasma biomarkers in a high-dose human supplementation trial." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(4): 804-810.

Butterfield, D. A. and R. Sultana (2011). "Methionine-35 of A $\beta$  (1-42): Importance for Oxidative Stress in Alzheimer Disease." Journal of Amino Acids **2011**: 10.

Cai, Z. and Y. Yan (2007). Pathway and mechanism of oxidative stress in Alzheimer's disease. Journal of Medical Colleges of PLA. **22**: 320-324.

Chauhan, V. and A. Chauhan (2006). "Oxidative stress in Alzheimer's disease." Pathophysiology **13**(3): 195-208.

Choi, S. H., S. Aid, L. Caracciolo, S. S. Minami, T. Niikura, Y. Matsuoka, R. S. Turner, M. P. Mattson and F. Bosetti (2013). "Cyclooxygenase-1 inhibition reduces amyloid pathology and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease." J Neurochem **124**(1): 59-68.

Combs, G. F., Jr. (2001). "Selenium in global food systems." Br J Nutr **85**(5): 517-547.

Crews, L. and E. Masliah (2010). "Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease." Hum Mol Genet **19**(R1): R12-20.

Cuajungco, M. P., K. Y. Faget, X. Huang, R. E. Tanzi and A. I. Bush (2000). "Metal chelation as a potential therapy for Alzheimer's disease." Ann N Y Acad Sci **920**: 292-304.

Cunningham, E. L. and A. P. Passmore (2013). "Drug development in dementia." Maturitas **76**(3): 260-266.

de Bortoli, M. C. and S. M. Cozzolino (2009). "Zinc and selenium nutritional status in vegetarians." Biol Trace Elem Res **127**(3): 228-233.

Dedeoglu, A., K. Cormier, S. Payton, K. A. Tseitlin, J. N. Kremsky, L. Lai, X. Li, R. D. Moir, R. E. Tanzi, A. I. Bush, N. W. Kowall, J. T. Rogers and X. Huang (2004). "Preliminary studies of a novel bifunctional metal chelator targeting Alzheimer's amyloidogenesis." Exp Gerontol **39**(11-12): 1641-1649.

Diaz-Castro, J., M. L. Ojeda, M. J. Alferez, I. Lopez-Aliaga, T. Nestares and M. S. Campos (2011). "Se bioavailability and glutathione peroxidase activity in iron deficient rats." J Trace Elem Med Biol **25**(1): 42-46.

Diaz, A., K. Rojas, B. Espinosa, R. Chavez, E. Zenteno, D. Limon and J. Guevara (2014). "Aminoguanidine treatment ameliorates inflammatory responses and memory impairment induced by amyloid-beta 25-35 injection in rats." Neuropeptides **48**(3): 153-159.

Dickson, R. C. and R. H. Tomlinson (1967). "Selenium in blood and human tissues." Clin Chim Acta **16**(2): 311-321.

Ding, Y., A. Qiao, Z. Wang, J. S. Goodwin, E. S. Lee, M. L. Block, M. Allsbrook, M. P. McDonald and G. H. Fan (2008). "Retinoic acid attenuates beta-amyloid deposition and rescues memory deficits in an Alzheimer's disease transgenic mouse model." J Neurosci **28**(45): 11622-11634.

Dumont, E., F. Vanhaecke and R. Cornelis (2006). "Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review." Anal Bioanal Chem **385**(7): 1304-1323.

Dysken, M. W., P. D. Guarino, J. E. Vertrees, S. Asthana, M. Sano, M. Llorente, M. Pallaki, S. Love, G. D. Schellenberg, J. R. McCarten, J. Malphurs, S. Prieto, P. Chen, D. J. Loreck, S. Carney, G. Trapp, R. S. Bakshi, J. E. Mintzer, J. L. Heidebrink, A. Vidal-Cardona, L. M. Arroyo, A. R. Cruz, N. W. Kowall, M. P. Chopra, S. Craft, S. Thielke, C. L. Turvey, C. Woodman, K. A. Monnell, K. Gordon, J. Tomaska and G. Vatassery (2014). "Vitamin E and memantine in Alzheimer's disease: clinical trial methods and baseline data." Alzheimers Dement **10**(1): 36-44.

Elder, G. A., M. A. Gama Sosa and R. De Gasperi (2010). "Transgenic mouse models of Alzheimer's disease." Mt Sinai J Med **77**(1): 69-81.

Ellul, J., N. Archer, C. M. Foy, M. Poppe, H. Boothby, H. Nicholas, R. G. Brown and S. Lovestone (2007). "The effects of commonly prescribed drugs in patients with Alzheimer's disease on the rate of deterioration." J Neurol Neurosurg Psychiatry **78**(3): 233-239.

Eng, L. F., R. S. Ghirnikar and Y. L. Lee (2000). "Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000)." Neurochem Res **25**(9-10): 1439-1451.

Fairweather-Tait, S. J., Y. Bao, M. R. Broadley, R. Collings, D. Ford, J. E. Hesketh and R. Hurst (2011). "Selenium in human health and disease." Antioxid Redox Signal **14**(7): 1337-1383.

Ferreira, K. S., J. C. Gomes, C. R. Bellato and C. P. Jordão (2002). "Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil." Revista Panamericana de Salud Pública **11**: 172-177.

Finder, V. H. and R. Glockshuber (2007). "Amyloid-beta aggregation." Neurodegener Dis **4**(1): 13-27.

Finley, J. W. (2006). "Bioavailability of selenium from foods." Nutr Rev **64**(3): 146-151.

Flood, J. F. and A. Cherkin (1986). "Scopolamine effects on memory retention in mice: a model of dementia?" Behav Neural Biol **45**(2): 169-184.

Gad, M. A. and S. M. Abd El-Twab (2009). "Selenium toxicosis assessment (in vivo and in vitro) and the protective role of vitamin B12 in male quail (Coturnix Coturnix)." Environ Toxicol Pharmacol **27**(1): 7-16.

Giunta, B., F. Fernandez, W. V. Nikolic, D. Obregon, E. Rrapo, T. Town and J. Tan (2008). "Inflammaging as a prodrome to Alzheimer's disease." J Neuroinflammation **5**: 51.

Goddyn, H., S. Leo, T. Meert and R. D'Hooge (2006). "Differences in behavioural test battery performance between mice with hippocampal and cerebellar lesions." Behav Brain Res **173**(1): 138-147.

Goedert, M. and M. G. Spillantini (2006). A century of Alzheimer's disease. Science. **314**: 777-780.

Gunn-Moore, D. A., J. McVee, J. M. Bradshaw, G. R. Pearson, E. Head and F. J. Gunn-Moore (2006). "Ageing changes in cat brains demonstrated by beta-amyloid and AT8-immunoreactive phosphorylated tau deposits." J Feline Med Surg **8**(4): 234-242.

Halliwell, B. (1991). Reactive Oxygen Species in Living Systems: Source, Biochemistry, and Role in Human Disease. The American Journal of Medicine. **91**: 14-22.

Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods in Enzymology. **186**: 1-85.

Harkany, T., I. Abraham, W. Timmerman, G. Laskay, B. Toth, M. Sasvari, C. Konya, J. B. Sebens, J. Korf, C. Nyakas, M. Zarandi, K. Soos, B. Penke and P. G. Luiten (2000). "beta-amyloid neurotoxicity is mediated by a glutamate-triggered excitotoxic cascade in rat nucleus basalis." Eur J Neurosci **12**(8): 2735-2745.

Harkany, T., S. O'Mahony, J. P. Kelly, K. Soos, I. Toro, B. Penke, P. G. Luiten, C. Nyakas, K. Gulya and B. E. Leonard (1998). "Beta-amyloid(Phe(SO<sub>3</sub>H)<sub>24</sub>)<sub>25-35</sub> in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation." Behav Brain Res **90**(2): 133-145.

Harthill, M. (2011). "Review: micronutrient selenium deficiency influences evolution of some viral infectious diseases." Biol Trace Elem Res **143**(3): 1325-1336.

Hassan, W., M. Ibrahim and J. B. Rocha (2009). "Towards the mechanism and comparative effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen under various pathophysiological conditions in rat's kidney preparation." Chem Biol Interact **182**(1): 52-58.

Hatfield, D. L., P. A. Tsuji, B. A. Carlson and V. N. Gladyshev (2014). "Selenium and selenocysteine: roles in cancer, health, and development." Trends Biochem Sci **39**(3): 112-120.

Hawkes, W. C., F. Z. Alkan and L. Oehler (2003). "Absorption, distribution and excretion of selenium from beef and rice in healthy North American men." J Nutr **133**(11): 3434-3442.

Hays, S. M., K. Macey, A. Nong and L. L. Aylward (2014). "Biomonitoring Equivalents for selenium." Regul Toxicol Pharmacol **70**(1): 333-339.

Helmes, E. and T. Ostbye (2002). Beyond memory impairment cognitive changes in Alzheimer's disease. Archives of Clinical Neuropsychology. **17**: 179-193.

Heneka, M. T. and M. K. O'Banion (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. Journal of Neuroimmunology. **184**: 69-91.

Hernandez-Guillamon, M., S. Mawhirt, S. Blais, J. Montaner, T. A. Neubert, A. Rostagno and J. Ghiso (2015). "Sequential Amyloid-beta Degradation by the Matrix Metalloproteases MMP-2 and MMP-9." J Biol Chem **290**(24): 15078-15091.

Hiramatsu, M., M. Sasaki, T. Nabeshima and T. Kameyama (1997). "Effects of dynorphin A (1-13) on carbon monoxide-induced delayed amnesia in mice." Pharmacol Biochem Behav **56**(1): 73-79.

Hsiao, K., P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yang and G. Cole (1996). "Correlative memory deficits, A $\beta$  elevation, and amyloid plaques in transgenic mice." Science **274**(5284): 99-102.

Institute of Medicine, I. (2000). Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington (DC), National Academies Press.

Keberle, H. (1964). "The Biochemistry of Desferrioxamine and Its Relation to Iron Metabolism." Ann N Y Acad Sci **119**: 758-768.

Kim, H. G., M. Moon, J. G. Choi, G. Park, A. J. Kim, J. Hur, K. T. Lee and M. S. Oh (2014). "Donepezil inhibits the amyloid-beta oligomer-induced microglial activation in vitro and in vivo." Neurotoxicology **40**: 23-32.

Kozlowski, H., A. Janicka-Klos, J. Brasun, E. Gaggelli, D. Valensin and G. Valensin (2009). "Copper, iron, and zinc ions homeostasis and their role in neurodegenerative disorders (metal uptake, transport, distribution and regulation)." Coordination Chemistry Reviews **253**(21-22): 2665-2685.

Kryukov, G. V., S. Castellano, S. V. Novoselov, A. V. Lobanov, O. Zehtab, R. Guigo and V. N. Gladyshev (2003). "Characterization of mammalian selenoproteomes." Science **300**(5624): 1439-1443.

Laferla, F. M., K. N. Green and S. Oddo (2007). Intracellular amyloid- $\beta$  in Alzheimer's disease. Nature Neuroscience. **8**: 499-509.

Lannfelt, L., N. R. Relkin and E. R. Siemers (2014). "Amyloid-ss-directed immunotherapy for Alzheimer's disease." J Intern Med **275**(3): 284-295.

Lansdall, C. J. (2014). "An effective treatment for Alzheimer's disease must consider both amyloid and tau." Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research **7**: hzu002-hzu002.

Lau, K. F., W. M. Chan, M. S. Perkinson, E. L. Tudor, R. C. Chang, H. Y. Chan, D. M. McLoughlin and C. C. Miller (2008). "Dexas1 interacts with FE65 to regulate FE65-amyloid precursor protein-dependent transcription." J Biol Chem **283**(50): 34728-34737.

Lawlor, P. A. and D. Young (2011). A $\beta$  Infusion and Related Models of Alzheimer Dementia. Animal Models of Dementia. P. P. De Deyn and D. Van Dam. Totowa, NJ, Humana Press: 347-370.

Lee, H. G., G. Perry, P. I. Moreira, M. R. Garrett, Q. Liu, X. Zhu, A. Takeda, A. Nunomura and M. A. Smith (2005). "Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector?" Trends Mol Med **11**(4): 164-169.

Lemere, C. A., J. Oh, H. A. Stanish, Y. Peng, I. Pepivani, A. M. Fagan, H. Yamaguchi, S. V. Westmoreland and K. G. Mansfield (2008). "Cerebral amyloid-beta protein accumulation with aging in cotton-top tamarins: a model of early Alzheimer's disease?" Rejuvenation Res **11**(2): 321-332.

Loscalzo, J. (2014). "Keshan disease, selenium deficiency, and the selenoproteome." N Engl J Med **370**(18): 1756-1760.

MacFarquhar, J. K., D. L. Broussard, P. Melstrom, R. Hutchinson, A. Wolkin, C. Martin, R. F. Burk, J. R. Dunn, A. L. Green, R. Hammond, W. Schaffner and T. F. Jones (2010). "Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement." Arch Intern Med **170**(3): 256-261.

Mariani, E., M. C. Polidori, A. Cherubini and P. Mecocci (2005). "Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **827**(1): 65-75.

Martorana, A., Z. Esposito and G. Koch (2010). "Beyond the cholinergic hypothesis: do current drugs work in Alzheimer's disease?" CNS Neurosci Ther **16**(4): 235-245.

Maseko, T., D. L. Callahan, F. R. Dunshea, A. Doronila, S. D. Kolev and K. Ng (2013). "Chemical characterisation and speciation of organic selenium in cultivated selenium-enriched *Agaricus bisporus*." Food Chem **141**(4): 3681-3687.

Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. Nature. **430**: 631-639.

McGowan, E., J. Eriksen and M. Hutton (2006). "A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice." Trends Genet **22**(5): 281-289.

McKillop, A. (2002). Main-Group Metal Organometallics in Organic Synthesis. University of East Anglia, UK, Pergamon.

McLaren, D. S. (1999). "Just 40 years ago." Nutrition **15**(3): 254, 256.

Mehdi, Y., J. L. Hornick, L. Istasse and I. Dufrasne (2013). "Selenium in the environment, metabolism and involvement in body functions." Molecules **18**(3): 3292-3311.

Mézes, M. and K. Balogh (2009). "Prooxidant mechanisms of selenium toxicity – a review." Acta Biologica Szegediensis **53**: 15-18.

Migliore, L., I. Fontana, R. Colognato, F. Coppede, G. Siciliano and L. Murri (2005). "Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases." Neurobiol Aging **26**(5): 587-595.

Miura, T., K. Suzuki, N. Kohata and H. Takeuchi (2000). "Metal binding modes of Alzheimer's amyloid beta-peptide in insoluble aggregates and soluble complexes." Biochemistry **39**(23): 7024-7031.

Mohamed, T., A. Shakeri and P. P. Rao (2016). "Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry." Eur J Med Chem **113**: 258-272.

Moore, S., L. D. Evans, T. Andersson, E. Portelius, J. Smith, T. B. Dias, N. Saurat, A. McGlade, P. Kirwan, K. Blennow, J. Hardy, H. Zetterberg and F. J. Livesey (2015). "APP metabolism regulates tau proteostasis in human cerebral cortex neurons." Cell Rep **11**(5): 689-696.

Morales, I., G. Farias and R. B. Maccioni (2010). "Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease." Neuroimmunomodulation **17**(3): 202-204.

Nadler, J. J., S. S. Moy, G. Dold, D. Trang, N. Simmons, A. Perez, N. B. Young, R. P. Barbaro, J. Piven, T. R. Magnuson and J. N. Crawley (2004). "Automated apparatus for quantitation of social approach behaviors in mice." Genes Brain Behav **3**(5): 303-314.

Naert, A., Z. Callaerts-Vegh and R. D'Hooge (2011). "Nocturnal hyperactivity, increased social novelty preference and delayed extinction of fear responses in post-weaning socially isolated mice." Brain Res Bull **85**(6): 354-362.

Naert, A., Z. Callaerts-Vegh, D. Moechars, T. Meert and R. D'Hooge (2011). "Vglut2 haploinsufficiency enhances behavioral sensitivity to MK-801 and amphetamine in mice." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **35**(5): 1316-1321.

Naini, S. M. A. and N. Soussi-Yanicostas (2015). "Tau Hyperphosphorylation and Oxidative Stress, a Critical Vicious Circle in Neurodegenerative Tauopathies?" Oxidative Medicine and Cellular Longevity: 1-17.

Navarro-Alarcon, M. and C. Cabrera-Vique (2008). "Selenium in food and the human body: a review." Sci Total Environ **400**(1-3): 115-141.

Nicolau, K. C. and N. A. Petasis (1984). Selenium in Natural Products Synthesis. Philadelphia, PA, CIS, Inc.

Oddo, S., A. Caccamo, M. Kitazawa, B. P. Tseng and F. M. LaFerla (2003). "Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease." Neurobiol Aging **24**(8): 1063-1070.

Oddo, S., A. Caccamo, J. D. Shepherd, M. P. Murphy, T. E. Golde, R. Kaye, R. Metherate, M. P. Mattson, Y. Akbari and F. M. LaFerla (2003). "Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction." Neuron **39**(3): 409-421.

Olivieri, N. F. and G. M. Brittenham (1997). "Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia." Blood **89**(3): 739-761.

Pekny, M., U. Wilhelmsson and M. Pekna (2014). "The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis." Neurosci Lett **565**: 30-38.

Perez, S. E., S. Dar, M. D. Ikonovic, S. T. DeKosky and E. J. Mufson (2007). "Cholinergic forebrain degeneration in the APPswe/PS1DeltaE9 transgenic mouse." Neurobiol Dis **28**(1): 3-15.

Perroni, G. G. G. (2007). Capacidade funcional de indivíduos idosos portadores da doença de Alzheimer. Dissertação de Mestrado Universidade de São Paulo.

Pinton, S., T. B. Sampaio, R. M. Ramalho, C. M. Rodrigues and C. W. Nogueira (2013). "p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide prevents neurodegeneration and glial cell activation induced by streptozotocin in rats." J Alzheimers Dis **33**(1): 133-144.

Pinton, S., A. C. Souza, M. H. Sari, R. M. Ramalho, C. M. Rodrigues and C. W. Nogueira (2013). "p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide protects against amyloid-beta induced cytotoxicity in vitro and improves memory deficits in vivo." Behav Brain Res **247**: 241-247.

Portelius, E., N. Mattsson, U. Andreasson, K. Blennow and H. Zetterberg (2011). "Novel abeta isoforms in Alzheimer's disease - their role in diagnosis and treatment." Curr Pharm Des **17**(25): 2594-2602.

Prince, M., R. Bryce, E. Albanese, A. Wimo, W. Ribeiro and C. P. Ferri (2013). "The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis." Alzheimers Dement **9**(1): 63-75 e62.

Prince, M., A. Wimo, M. Guerchet, G.-C. Ali, Y.-T. Wu and M. Prina (2015). World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia - An analysis of prevalence, incidence, cost and trends. London.

Qiu, C., M. Kivipelto and E. von Strauss (2009). "Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention." Dialogues Clin Neurosci **11**(2): 111-128.

Radde, R., T. Bolmont, S. A. Kaeser, J. Coomaraswamy, D. Lindau, L. Stoltze, M. E. Calhoun, F. Jaggi, H. Wolburg, S. Gengler, C. Haass, B. Ghetti, C. Czech, C. Holscher, P. M. Mathews and M. Jucker (2006). "A $\beta$ 42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology." EMBO Rep **7**(9): 940-946.

Ray, P. D., B.-W. Huang and Y. Tsuji (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cellular Signalling. **24**: 981-990.

Rayman, M. P. (2008). "Food-chain selenium and human health: emphasis on intake." Br J Nutr **100**(2): 254-268.

Risher, J., A. R. McDonald, M. J. Citra, S. Bosch and R. J. Amata (2003). Toxicological profile for selenium Atlanta, Georgia, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Rocha-Gonzalez, H. I., M. Ambriz-Tututi and V. Granados-Soto (2008). "Resveratrol: a natural compound with pharmacological potential in neurodegenerative diseases." CNS Neurosci Ther **14**(3): 234-247.

Rofina, J. E., A. M. van Ederen, M. J. Toussaint, M. Seceve, A. van der Spek, I. van der Meer, F. J. Van Eerdenburg and E. Gruys (2006). "Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease." Brain Res **1069**(1): 216-226.

Roman, M., P. Jitaru and C. Barbante (2014). "Selenium biochemistry and its role for human health." Metallomics **6**(1): 25-54.

Roy, S., B. Zhang, V. M. Lee and J. Q. Trojanowski (2005). "Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases." Acta Neuropathol **109**(1): 5-13.

Royal Society of Chemistry, R. (2016). "Periodic table: Selenium." Retrieved 17 de fevereiro, 2017, from <http://www.rsc.org/periodic-table/element/34/selenium>.

Sarter, M., G. Bodewitz and D. N. Stephens (1988). "Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alteration behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist beta-carbolines." Psychopharmacology (Berl) **94**(4): 491-495.

Sayre, L. M., G. Perry and M. A. Smith (2008). "Oxidative stress and neurotoxicity." Chem Res Toxicol **21**(1): 172-188.

Selkoe, D. J. (1996). "Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease." J Biol Chem **271**(31): 18295-18298.

Selkoe, D. J. (2001). "Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy." Physiol Rev **81**(2): 741-766.

Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. Physiological Reviews. **81**: 741-766.

Selkoe, D. J. (2004). Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. Nature Cell Biology. **6**: 1054-1061.

Shamberger, R. J. (1983). Biochemistry of Selenium. New York, NY, Plenum.

Singh, M., M. Kaur, H. Kukreja, R. Chugh, O. Silakari and D. Singh (2013). "Acetylcholinesterase inhibitors as Alzheimer therapy: from nerve toxins to neuroprotection." Eur J Med Chem **70**: 165-188.

Sipos, E., A. Kurunczi, A. Kasza, J. Horvath, K. Felszeghy, S. Laroche, J. Toldi, A. Parducz, B. Penke and Z. Penke (2007). "Beta-amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease." Neuroscience **147**(1): 28-36.

Souchay, C. (2007). Metamemory in Alzheimer's disease. Cortex. **43**: 987-1003.

Spiazzi, C. C., M. B. Soares, A. P. Izaguirry, L. M. Vargas, M. M. Zanchi, N. Frasson Pavin, R. Ferreira Affeldt, D. L. Seibert, M. Prigol and F. W. Santos (2015). "Selenofuranoside Ameliorates Memory Loss in Alzheimer-Like Sporadic Dementia: AChE Activity, Oxidative Stress, and Inflammation Involvement." Oxidative Medicine and Cellular Longevity **2015**: 9.

Spiller, H. A. and E. Pfeifer (2007). "Two fatal cases of selenium toxicity." Forensic Sci Int **171**(1): 67-72.

Strozyk, D., L. J. Launer, P. A. Adlard, R. A. Cherny, A. Tsatsanis, I. Volitakis, K. Blennow, H. Petrovitch, L. R. White and A. I. Bush (2009). "Zinc and copper modulate Alzheimer Abeta levels in human cerebrospinal fluid." Neurobiol Aging **30**(7): 1069-1077.

Sturchler-Pierrat, C., D. Abramowski, M. Duke, K. H. Wiederhold, C. Mistl, S. Rothacher, B. Ledermann, K. Burki, P. Frey, P. A. Paganetti, C. Waridel, M. E. Calhoun, M. Jucker, A. Probst, M. Staufenbiel and B. Sommer (1997). "Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13287-13292.

Swomley, A. M., S. Forster, J. T. Keeney, J. Triplett, Z. Zhang, R. Sultana and D. A. Butterfield (2014). "Aβ, oxidative stress in Alzheimer disease: evidence based on proteomics studies." Biochim Biophys Acta **1842**(8): 1248-1257.

Sy, M., M. Kitazawa and F. LaFerla (2011). The 3xTg-AD Mouse Model: Reproducing and Modulating Plaque and Tangle Pathology. Animal Models of Dementia. P. P. De Deyn and D. Van Dam. Totowa, NJ, Humana Press: 469-482.

Tabet, N. and H. Feldman (2003). "Ibuprofen for Alzheimer's disease." Cochrane Database Syst Rev(2): CD004031.

Tekirian, T. L., G. M. Cole, M. J. Russell, F. Yang, D. R. Wekstein, E. Patel, D. A. Snowdon, W. R. Markesbery and J. W. Geddes (1996). "Carboxy terminal of beta-amyloid deposits in aged human, canine, and polar bear brains." Neurobiol Aging **17**(2): 249-257.

United States Department of Agriculture, U. (2016). "USDA National Nutrient Database for Standard Reference Release 28." Retrieved 17 de fevereiro, 2017, from <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/report/nutrientsfrm?max=25&offset=0&totalCount=0&nutrient1=317&nutrient2=&nutrient3=&subset=0&sort=f&measureby=m>.

Valko, M., H. Morris and M. T. Cronin (2005). "Metals, toxicity and oxidative stress." Curr Med Chem **12**(10): 1161-1208.

Van Broeckhoven, C., J. Haan, E. Bakker, J. A. Hardy, W. Van Hul, A. Wehnert, M. Vegter-Van der Vlis and R. A. Roos (1990). "Amyloid beta protein precursor gene and hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch)." Science **248**(4959): 1120-1122.

Van Dam, D. and P. P. De Deyn (2006). "Drug discovery in dementia: the role of rodent models." Nat Rev Drug Discov **5**(11): 956-970.

Van Dam, D. and P. P. De Deyn (2011). "Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease." Br J Pharmacol **164**(4): 1285-1300.

Varadarajan, S., J. Kanski, M. Aksenova, C. Lauderback and D. A. Butterfield (2001). "Different mechanisms of oxidative stress and neurotoxicity for Alzheimer's Aβ(1-42) and Aβ(25-35)." J Am Chem Soc **123**(24): 5625-5631.

Vassar, R. (2014). "BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease." Alzheimers Res Ther **6**(9): 89.

Wang, D. D. and A. Bordey (2008). "The astrocyte odyssey." Prog Neurobiol **86**(4): 342-367.

Wang, X., W. Wang, L. Li, G. Perry, H. G. Lee and X. Zhu (2014). "Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease." Biochim Biophys Acta **1842**(8): 1240-1247.

Weinreb, O., T. Amit, O. Bar-Am and M. B. Youdim (2016). "Neuroprotective effects of multifaceted hybrid agents targeting MAO, cholinesterase, iron and beta-amyloid in ageing and Alzheimer's disease." Br J Pharmacol **173**(13): 2080-2094.

White, J. A., A. M. Manelli, K. H. Holmberg, L. J. Van Eldik and M. J. Ladu (2005). "Differential effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta 1-42 on astrocyte-mediated inflammation." Neurobiol Dis **18**(3): 459-465.

Wollenhaupt, S. G. N., A. T. Soares, W. G. Salgueiro, S. NoreMBERG, G. Reis, C. Viana, P. Gubert, F. A. Soares, R. F. Affeldt, D. S. Ludtke, F. W. Santos, C. C. Denardin, M. Aschner and D. S. Avila (2014). "Seleno- and Telluro-xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in C.elegans via the DAF-16/FOXO pathway." Food and Chemical Toxicology **64**: 192-199.

Wong, K. K., M. T. Ho, H. Q. Lin, K. F. Lau, J. A. Rudd, R. C. Chung, K. P. Fung, P. C. Shaw and D. C. Wan (2010). "Cryptotanshinone, an acetylcholinesterase inhibitor from *Salvia miltiorrhiza*, ameliorates scopolamine-induced amnesia in Morris water maze task." Planta Med **76**(3): 228-234.

Xu, W., C. Ferrari and H.-X. Wang (2013). Epidemiology of Alzheimer's Disease. Understanding Alzheimer's Disease. P. I. Zerr, InTech.

Yamada, M., T. Chiba, J. Sasabe, M. Nawa, H. Tajima, T. Niikura, K. Terashita, S. Aiso, Y. Kita, M. Matsuoka and I. Nishimoto (2005). "Implanted cannula-mediated repetitive administration of Abeta25-35 into the mouse cerebral ventricle effectively impairs spatial working memory." Behav Brain Res **164**(2): 139-146.

Yan, M. H., X. Wang and X. Zhu (2013). "Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease." Free Radic Biol Med **62**: 90-101.

Yiannopoulou, K. G. and S. G. Papageorgiou (2013). "Current and future treatments for Alzheimer's disease." Ther Adv Neurol Disord **6**(1): 19-33.

Zaborszky, L., A. v. d. Pol and E. Gyengesi (2012). The Basal Forebrain Cholinergic Projection System in Mice. The Mouse Nervous System. C. Watson, G. Paxinos and L. Puelles, Elsevier: 684-709.

Zachara, B. A., H. Pawluk, E. Bloch-Boguslawska, K. M. Sliwka, J. Korenkiewicz, Z. Skok and K. Ryc (2001). "Tissue level, distribution, and total body selenium content in healthy and diseased humans in Poland." Arch Environ Health **56**(5): 461-466.

Zhu, X., H. G. Lee, G. Perry and M. A. Smith (2007). "Alzheimer disease, the two-hit hypothesis: an update." Biochim Biophys Acta **1772**(4): 494-502.

## ANEXO I – Certificado de aprovação de Protocolo para uso de animais em pesquisa



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

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

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

---

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

Número de protocolo da CEUA: **012/2013**

Título: **EFEITO NEUROPROTETOR DE COMPOSTOS ORGÂNICOS DE SELÊNIO EM UM MODELO DA DOENÇA DE ALZHEIMER INDUZIDO PELO PEPTÍDEO B-AMILÓIDE EM CAMUNDONGOS**

Data da aprovação: **01/08/2013**

Período de vigência do projeto: De: **08/2013** Até: **08/2016**

Pesquisador: **FRANCIELLI WEBER SANTOS CIBIN**

Campus: **URUGUAIANA**

Telefone: **(55) 99688269**

E-mail: [francielliweber@yahoo.com.br](mailto:francielliweber@yahoo.com.br)

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alessandra S. K. Tamajusuku Neis', written over a horizontal line.

Alessandra S. K. Tamajusuku Neis  
Professor Adjunto  
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA