

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**ANA THALITA GONÇALVES SOARES**

**ORGANOSELENOTRIAZÓIS ATENUAM O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO  
POR DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CAENORHABDITIS ELEGANS**

**Uruguiana  
2017**

**ANA THALITA GONÇALVES SOARES**

**ORGANOSELENOTRIAZÓIS ATENUAM O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO  
POR DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CAENORHABDITIS ELEGANS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Bioquímica.

Área de Concentração: Bioprospecção Molecular

Orientador: Daiana Silva de Ávila

**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) .

S676o Soares, Ana Thalita Gonçalves

ORGANOSELENOTRIAZÓIS ATENUAM O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CAENORHABDITIS ELEGANS / Ana

Thalita Gonçalves Soares.

59 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2017.

"Orientação: Daiana Silva de Ávila".

1. compostos organicos de Selenio. 2. C. elegans. I. Título.

ANA THALITA GONÇALVES SOARES

**ORGANOSELENOTRIAZÓIS ATENUAM O ESTRESSE OXIDATIVO  
INDUZIDO POR DISFUNÇÃO MITOCONDRIAL EM CAENORHABDITIS  
ELEGANS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Área de Concentração:  
Bioprospecção Molecular

Dissertação defendida e aprovada em: 21 de dezembro de 2017.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Daiana Silva de Ávila  
Orientadora  
UNIPAMPA

---

*Mariela Feiffer Charão*  
Dr<sup>a</sup> Mariela Feiffer Charão  
Feevale

---

*Caroline Brandão Quines*  
Prof. Dr<sup>a</sup> Caroline Brandão Quines  
UFSM

Dedico este trabalho à minha filha, Ana Clara,  
por ter dado sentido a tudo isso

## AGRADECIMENTO

Inicio essa parte agradecendo as pessoas que mais me apoiaram nessa trajetória acadêmica: minha família! Mãe, obrigada por me mostrar que a fé move montanhas, Paloma e Mana obrigada por sempre apoiarem minhas decisões e por todo incentivo. Vocês me deram força nos momentos que eu mais precisei, e hoje, junto com a Ana Clara, são a minha maior riqueza. Meu querido pai, que não está mais entre nós, mas que se faz presente todos os dias em minha vida: Gratidão pelo tempo que Deus permitiu que estivéssemos juntos e por me ensinar a fazer o bem sem olhar a quem. Eu amo vocês para o todo o sempre!

Minha filha, Ana Clara, obrigada por me dar forças pra seguir a diante e por dar sentido a minha vida. O amor que sinto por ti está além do que palavras possam dizer. Obrigada por ter me escolhido.

Alexandre, obrigada por todo apoio e paciência mesmo que há mais de 4000 km de distância, estar contigo é a segunda melhor coisa que aconteceu durante o mestrado. Te amo!

A minha orientadora, Daiana, agradeço imensamente por não ter desistido de mim quando eu deixei a desejar e por ter me dado apoio e suporte para encarar o mestrado durante a gestação. Obrigada por esses seis anos de aprendizado, pela confiança e compreensão. É com muita satisfação que finalizo meu vínculo com a universidade e com o laboratório, mais madura, mais profissional e muito mais determinada, obrigada por isso!

A UNIPAMPA pela oportunidade e suporte.

A CAPES, pela concessão de uma bolsa de estudos.

Ao pessoal do GBToxCe, todos que passaram, todos que ficaram, todos que ficaram e já saíram durante esses anos: obrigada pelo companheirismo, parceria, pelas fofocas e tretas. Willian, Luiz e Cris Nutri, agradeço pela colaboração na execução dos experimentos. Ana Helena, Andreia, Hodara, Eugênia e Mauricio, obrigada pela amizade, vocês são pessoas que valem a pena ter por perto, mesmo que à distância. Outros colegas que apesar de não fazerem mais parte do meu convívio foram muito importantes nessa caminhada: Daiandra, Fabrine, Liliana, Willian, Mariani. Lembrarei de todos vocês com muito carinho e desejo que todos continuem buscando seus sonhos e tenham muito sucesso na vida.

Sejam felizes!

“Eu, porém estou sempre contigo, tu me  
agarraste pela mão direita.”

Salmo 73:23

## RESUMO

Compostos orgânicos de Selênio possuem diversas atividades farmacológicas já descritas, como atividade anti-inflamatória e antitumoral, principalmente devido aos seus efeitos antioxidantes. Por serem promissores na farmacologia, as sínteses desses compostos tem aumentado significativamente. Como muitas novas moléculas são sintetizadas o uso de um modelo simples como *Caenorhabditis elegans* é altamente vantajoso para avaliação inicial da toxicidade e do potencial terapêutico destas moléculas. O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade e o potencial antioxidante de três compostos Arilselanil-alquil-1,2,3-triazóis em *C. elegans*. Os animais foram expostos aos compostos em meio líquido por apenas 30 minutos no primeiro estágio larval (L1). Os compostos testados não apresentaram efeitos tóxicos nas concentrações testadas (1µM-1000 µM) em *C. elegans*. O tratamento com os Arilselanil-alquil-1,2,3-triazóis (10 µM) reverteu parcialmente o estresse induzido pelo pesticida paraquat (1 mM), uma toxina mitocondrial. Apenas o composto SeTz-2 (10 µM) aumentou parcialmente a sobrevivência dos vermes tratados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM). Os compostos também aumentaram a longevidade dos vermes mutantes *mev-1*, que possuem um reduzido tempo de vida pela produção em excesso de EROs na mitocôndria causada por uma alteração no complexo 2 da cadeia transportadora de elétrons. Além disso, os compostos reduziram os níveis de espécies reativas de oxigênio determinados pelo probe fluorescente H<sub>2</sub>DCF-DA bem como também reduziram a atividade da enzima catalase nesses animais mutantes. Baseado nos resultados encontrados é possível concluir que os compostos Arilselanil-alquil-1,2,3-triazóis possuem atividade antioxidante principalmente em condição de estresse oxidativo mitocondrial em *C. elegans*.

Palavras-Chave: *C. elegans*, Selênio, estresse oxidativo, mitocôndria.



## ABSTRACT

Organic selenium molecules have many described pharmacological activities, such as anti-inflammatory and anti-tumoral, which are mainly due to their antioxidant effects. As they are promising pharmacological agents, their synthesis has grown significantly. Once many new molecules synthesized every day, the use of a simple animal model, such as the *Caenorhabditis elegans*, is highly valuable for initial toxicity and pharmacological potential evaluation of these molecules. The goal of this study was to evaluate the toxicity and the antioxidant capacity of three arylselenanyl-alkyl-1,2,3-triazoles in *C. elegans*. The animals were exposed to the molecules in liquid media for 30 minutes at the first larval stage (L1). There were no toxic effects over animals' viability within the range of tested concentrations (1 $\mu$ M-1000  $\mu$ M). Exposure to 10  $\mu$ M of arylselenanyl-alkyl-1,2,3-triazoles has partially reversed the stress induced by the pesticide paraquat (1 mM), which is a mitochondrial toxin. Only SeTz-2 (10  $\mu$ M) improved the viability of the animals exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM). The arylselenanyl-alkyl-1,2,3-triazoles also improved *mev-1* mutants' lifespan, which is normally decreased by excessive mitochondrial ROS production due to an alteration in a subunit of their mitochondrial complex 2. Also, the molecules were able to reduce ROS levels measured by the fluorescent probe H<sub>2</sub>DCF-DA, as well as they also reduced catalase enzyme' activity. Based on our findings, it is possible to suggest that these molecules have antioxidant activity in *C. elegans*, mainly when facing mitochondrial oxidative stress.

Keywords: *C. elegans*; Selenium; Oxidative stress; Mitochondria.

## **APRESENTAÇÃO**

A presente dissertação foi desenvolvida em três partes:

### **PARTE UM**

As seções Introdução, Revisão Bibliográfica, Justificativa e Objetivos encontram-se nessa parte inicial.

### **PARTE DOIS**

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está apresentado da mesma forma que será submetido à revista ***Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology***.

### **PARTE TRÊS**

As conclusões e perspectivas do presente trabalho encontram-se nesta parte final.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Neurônios marcados com GFP em <i>C. elegans</i> .....	14
Figura 2 – Ciclo de vida do nematoide <i>C. elegans</i> .....	14
Figura 3 – Espécies reativas de oxigênio e seu papel no desenvolvimento de doenças relacionadas ao desenvolvimento .....	16
Figura 4 – Reações das principais enzimas antioxidantes .....	19
Figura 5 – Estrutura do Ebselen.....	23
Figura 6 – Estrutura do Disseleneto de Difenila .....	23

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 O estresse oxidativo .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1 O papel da mitocôndria no estresse oxidativo e no equilíbrio redox .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 O sistema redox.....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Selênio.....</b>	<b>21</b>
<b>2.4.1 Compostos orgânicos de Selênio.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 Farmacologia dos Heterociclos: Ênfase em 1,2,3-triazóis.....</b>	<b>25</b>
<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>27</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
<b>MANUSCRITO: Organoselenotriazoles attenuate oxidative damage induced by mitochondrial dysfunction in mev-1 <i>Caenorhabditis elegans</i> mutants.....</b>	<b>29</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>

## INTRODUÇÃO

Compostos orgânicos de Selênio são amplamente estudados por sua variedade de efeitos farmacológicos já descritos, como atividade anti-inflamatória, imunomoduladora, hepatoprotetora e quimioterapêutica, além de ação benéfica em modelos de Alzheimer e Parkinson (Nogueira *et al.*, 2004; Uzma *et al.*, 2011). Tais propriedades têm sido atribuídas principalmente à capacidade desses compostos em equilibrar o sistema redox, através da mimetização da atividade da enzima Glutathione Peroxidase (GPX) e aos seus efeitos oxidantes em grupamentos tióis (Griffith, 1999; Nogueira e Rocha, 2011; Orian e Toppo, 2014).

Com o crescente desenvolvimento de novos compostos potencialmente candidatos a novos fármacos, o uso de um modelo complementar e simples para o *screening* toxicológico, bem como o rastreo da capacidade farmacológica, oferece uma grande vantagem na pesquisa inicial pré-clínica. Nesse contexto o nematoide *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) oferece algumas vantagens, como seu fácil manuseio e curto ciclo de vida, além de 60-80% dos genes humanos terem ortologia no genoma desse pequeno invertebrado (Kaletta e Hengartner, 2006).

De fato, algumas moléculas orgânicas de selênio já foram avaliadas utilizando o modelo experimental *C. elegans*, como é o caso do composto selenoxilofuranosídeo, capaz de atenuar o estresse oxidativo induzido por manganês através da regulação da via DAF-16/FOXO, uma importante via de sinalização envolvida no envelhecimento e no estresse oxidativo (Wollenhaupt *et al.*, 2014). O composto orgânico disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> também apresentou efeitos farmacológicos em *C. elegans*, atenuando o estresse oxidativo induzido pelo peptídeo Aβ num modelo de doença de Alzheimer, sendo efetivo na recuperação da memória e da aprendizagem (Zamberlan *et al.*, 2014). Neste contexto, o *C. elegans* já foi validado como um bom modelo para *screening* de organocalcogênios.

Na presente dissertação, nós avaliamos a toxicidade e o potencial efeito de resistência ao estresse de uma série de compostos organoselenotriazóis no nematoide *C. elegans* em diferentes condições de estresse oxidativo, inclusive em condições de indução de dano mitocondrial pelo paraquat e por uma mutação na cadeia transportadora de elétrons.

## CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Caenorhabditis elegans*

*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) é um nematoide de vida livre da família Rhabditidae, podendo desta maneira ser cultivada na ausência de um hospedeiro ao longo de seu ciclo de vida, característica que permitiu que esse invertebrado se tornasse um modelo para análise *in vivo*. O modelo foi caracterizado geneticamente na busca de uma alternativa à solução dos problemas comumente encontrados na biologia molecular da época e assim *C. elegans* foi o primeiro organismo multicelular com uma sequência de genoma a ser completamente elucidada (Brenner, 1974; Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology, 1998), o que levou à identificação molecular de muitos genes-chave nos processos biológicos de desenvolvimento e celular. Atualmente mais de 1200 artigos utilizando *C. elegans* são publicados por ano (Corsi *et al.*, 2015).

A primeira vantagem no uso desse modelo alternativo está no seu pequeno tamanho, as larvas recém-incubadas medem cerca de 0,25 milímetros de comprimento e os adultos têm 1 milímetro de comprimento, o que permite a realização de experimentos que abordem a função e desenvolvimento celular através do uso de microscópio. Juntamente com seu tamanho reduzido, a transparência do corpo do verme permite a visualização de suas células individuais e detalhes subcelulares, bem como proteínas fluorescentes (Fig. 1). *C. elegans* possui um curto ciclo de vida, sua fase de desenvolvimento (de ovo a adulto) dura 3 dias (Fig. 2) e o tempo de vida total é de aproximadamente 25 dias além de serem hermafroditas autoferéis com elevada reprodução onde um único nematoide é capaz de gerar em torno de 300 ovos no seu período reprodutivo, embora possam surgir alguns machos numa frequência <0,2%. Além disso, esses animais são facilmente cultivados em placas de petri com meio de cultura e bactéria *E. coli* como fonte de alimento, sendo também economicamente vantajoso. Por possuir um número de células somáticas invariáveis é possível reproduzir mutações que dão origem a defeitos de desenvolvimento e comportamentais e que são prontamente identificadas em varreduras genéticas (Corsi *et al.*, 2015).

A semelhança entre processos celulares em *C. elegans* e outros animais tornam o nematoide um bom modelo para estudos biológicos. Como pelo menos 38% dos genes de codificação de proteínas de *C. elegans* predizem ortólogos do genoma humano (Shaye e Greenwald, 2011) e 60-80% dos genes humanos têm um ortologia no genoma de *C. elegans* (Kaletta e Hengartner, 2006) e 40% dos genes associados a doenças humanas têm ortologos no genoma de *C. elegans* (Culetto e Sattelle, 2000). Sendo assim as descobertas científicas realizadas com esse pequeno invertebrado possuem grande relevância para transposição dos resultados para humanos.

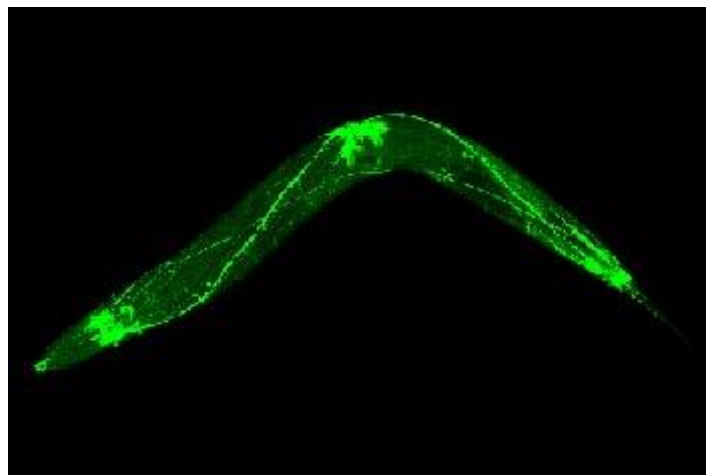


Fig. 1: Neurônios marcados com GFP em *C. elegans*. Fonte: <http://wormclassroom.org/>.

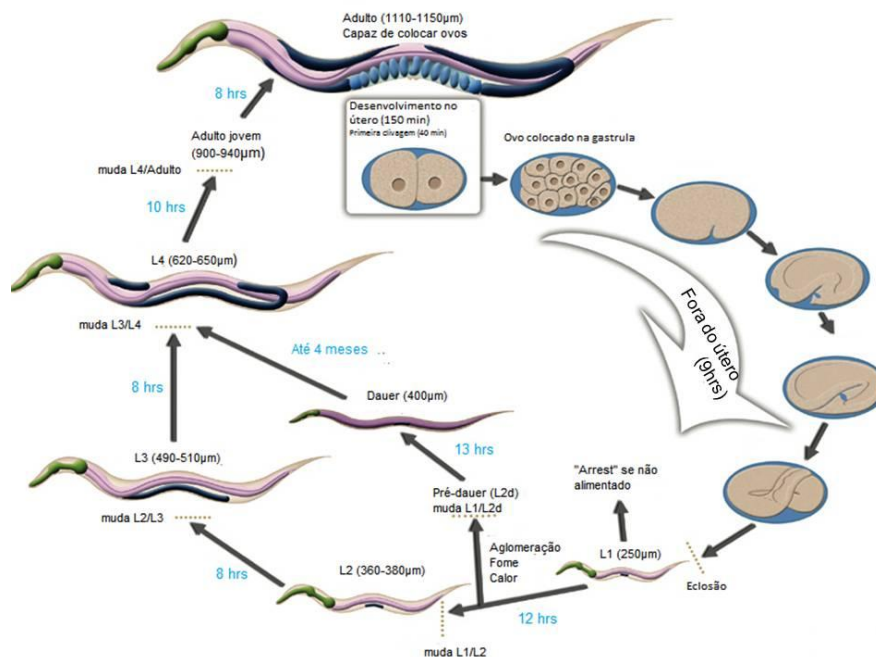


Fig. 2: Ciclo de vida do nematoide *C. elegans*. Fonte: <http://www.wormatlas.org/>. (Adaptado).

## 2.2 O estresse oxidativo

As Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) são produtos universais do metabolismo aeróbico e podem ser gerados durante a respiração celular ou através de enzimas específicas que parecem estar envolvidas na sinalização redox (Giorgio *et al.*, 2007; Burgoyne *et al.*, 2012). As EROs (i.e. como superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico) são essenciais para a homeostase celular, pois em baixos níveis participam de vias bioquímicas como, por exemplo, resposta celular contra infecções, reconhecimento intercelular e transdução de sinal, servindo assim como moléculas de sinalização (Satoh *et al.*, 2004; Sena e Chandel, 2012). No organismo, o equilíbrio do estado redox é baseado na geração e eliminação de EROs por fontes endógenas e exógenas. Quando há o desequilíbrio nesta homeostase ocorre o estresse oxidativo, que pode ser resultado de processos bioquímicos que conduzam a um aumento da produção de espécies reativas, exposição a agentes prejudiciais (i.e. poluentes ambientais e radiação) ou ainda da capacidade limitada do sistema antioxidante endógeno (Bickers e Athar, 2006; Hodjat *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo é responsável por causar danos a macromoléculas biológicas, além de genotoxicidade, induzindo a “patologias de radicais livres” (Halliwell, 2007) (Figura 3). Nesse contexto, o papel do estresse oxidativo em algumas doenças, principalmente aquelas que estão relacionadas com o envelhecimento, como a neurodegeneração, doenças cardiovasculares, inflamação, aterosclerose diabetes e a carcinogênese já está bem estabelecido (Rahman, 2007; Ray *et al.*, 2012).

Em relação a doenças cardiovasculares e aterosclerose, sabe-se que EROs oxidam lipoproteínas de baixa densidade (OxLDL) que se acumulam, levando a formação de placas ateroscleróticas e estimula o processo inflamatório e desenvolvimento da aterosclerose. O OxLDL também leva à disfunção endotelial que pode resultar no crescimento ou morte celular por apoptose levando à vasoconstrição. Nas doenças neurodegenerativas, a disfunção redox participa da agregação de proteína amiloide na doença de Alzheimer. Na doença de Huntington sabe-se que há um defeito na fosforilação oxidativa do córtex occipital e nos gânglios basais em pacientes acometidos pela patologia, já na doença de Parkinson,



evidências mostram que o estresse oxidativo causa perda de neurônios dopaminérgicos nigro-estriatais (Rahman, 2007).

Sobre o envolvimento de EROs no desenvolvimento de câncer sabe-se que o desequilíbrio do estado redox ativa oncogenes, aumentando a instabilidade genômica proliferação celular, a angiogênese, e o potencial metastático da célula, além de inibir a atividade de algumas proteínas fosfatases e ativação de proteínas quinases que estimulam o desenvolvimento, bem como a progressão de tumores (Georgieva *et al.*, 2017). Por fim, no diabetes, a hiperglicemia é responsável por causar o estresse oxidativo que pode levar a formação de produtos avançados de glicação (AGE) que por sua vez podem aumentar lesões vasculares envolvidas na retinopatia diabética, além de outras implicações clínicas (Rahman, 2007).



Figura 3: Espécies reativas de oxigênio e seu papel no desenvolvimento de doenças relacionadas ao desenvolvimento. Fonte: Própria autora.

### 2.2.1 O papel da mitocôndria no estresse oxidativo e no equilíbrio redox

As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela produção de ATP na célula (fosforilação oxidativa) e são extremamente importantes para o controle de processos celulares dependentes de ATP, essenciais para a viabilidade celular (L. Puntel *et al.*, 2015). Sabe-se que essas organelas participam também de muitas outras funções celulares, incluindo sinalização de cálcio, regulação do potencial de membrana, síntese de heme e esteroides, proliferação celular e apoptose (Georgieva *et al.*, 2017).

Na respiração mitocondrial, um fluxo de elétrons é criado através da cadeia respiratória estabelecendo um gradiente de prótons através da membrana mitocondrial interna, que é usado como fonte de energia para a síntese de ATP. Os elétrons são retirados de substratos reduzidos e transferidos para oxigênio molecular ( $O_2$ ) através de uma cadeia de complexos enzimáticos (I a IV). No passo final da cadeia transportadora de elétrons (CTE), a citocromo c oxidase (complexo IV) reduz totalmente o  $O_2$  na água sem formar radicais de oxigênio. No entanto, a redução parcial de  $O_2$ , que resulta na geração de EROs, pode ocorrer se o  $O_2$  interagir com CTE do complexo IV. Alguns elétrons podem escapar da CTE mitocondrial, especialmente dos complexos I e III, e reagirem com  $O_2$  para formar o ânion Superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Em torno de 2% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias é reduzido de forma parcial formando  $O_2^{\cdot-}$  que posteriormente será convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Giorgio *et al.*, 2007).

As EROs têm sido tradicionalmente considerados como subprodutos do metabolismo aeróbio e da respiração mitocondrial sendo a mitocôndria considerada a principal fonte intracelular de produção acidental de EROs (por exemplo,  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ ). A produção exacerbada de EROs é fortemente regulada pelas enzimas superóxido dismutase mitocondrial (SOD2), glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e antioxidantes não enzimáticos, como, por exemplo, vitaminas C e E e minerais como o selênio (Georgieva *et al.*, 2017). A disfunção mitocondrial só ocorre quando EROs atacam o sistema antioxidante encontrado nas mitocôndrias e pode levar a morte celular (L. Puntel *et al.*, 2015).

Nesse contexto, estudos demonstram o papel de agentes oxidantes na disfunção mitocondrial através de um aumento na geração de EROs mitocondrial. Além disso, foi proposto que o paraquat, um conhecido gerador de EROs, produz  $H_2O_2$  por ativar NADPH oxidase no cérebro e inativar a CTE através da sua redução por elétrons provenientes do complexo III da cadeia respiratória (Castello *et al.*, 2007). Outro estudo demonstrou que o  $H_2O_2$  leva a uma redução da atividade do complexo citocromo C oxidase e da ATP sintase da CTE (Li *et al.*, 2002). Além disso, fatores intrínsecos podem levar ao dano mitocondrial e ao desenvolvimento de diversas patologias. Desta maneira, a manutenção da integridade mitocondrial pode ser considerada ponto chave como estratégia para o tratamento dessas doenças.

### **2.3 O sistema redox**

As defesas antioxidantes são essenciais para estabelecer o equilíbrio redox celular e reduzir os danos causados pela condição oxidante, apresentando um papel fundamental na regulação do estresse oxidativo. O termo "antioxidante" refere-se a qualquer molécula capaz de estabilizar ou desativar radicais livres antes de atacar as células (Rahman, 2007). Os antioxidantes endógenos desempenham um papel crucial na manutenção de funções celulares, dentre eles, merecem destaque algumas enzimas antioxidantes e moléculas não enzimáticas, como a SOD, CAT, GPX e a glutathione (Figura 5).

As SODs são uma família de enzimas que catalisam a dismutação de  $O_2^{\cdot-}$  em oxigênio e  $H_2O_2$ . Existem 3 isoformas: a citosólica (Cu/Zn-SOD), a mitocondrial (Mn-SOD) e outra Cu/Zn-SOD localizada no espaço extracelular. A CAT catalisa a conversão de  $H_2O_2$  em água e oxigênio, é uma proteína homotetramérica contendo um grupamento heme de ferro, localizada nos peroxissomos. As GPxs são uma família de isoenzimas dependentes de selênio que catalisam a redução de  $H_2O_2$  ou hidroperóxidos orgânicos em água e álcoois através da oxidação de glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG). Glutathione redutase (GR) é responsável por reverter GSSG em GSH à custa de NADPH (Marrocco *et al.*, 2017).

Quando os antioxidantes endógenos não são suficientes para suprimir o estresse oxidativo fontes exógenas de defesa podem ser suplementadas para buscar a homeostase celular. Dentre as fontes exógenas os antioxidantes não enzimáticos ganham destaque, entre eles estão: as vitaminas E e C, carotenoides, flavonoides naturais e outros compostos que podem atuar minimizando os danos causados por EROs em macromoléculas, reduzindo a peroxidação lipídica, por exemplo, regulando os níveis das enzimas através da reciclagem das mesmas, ainda neutralizando os radicais livres diretamente ou por modularem a transcrição e tradução de genes envolvidos na homeostase redox (Rahman, 2007).

Nesse contexto, existe um grande interesse na síntese de moléculas que possam agir nas patologias associadas a radicais livres através da regulação do estado redox, mimetizando o efeito dos antioxidantes naturais. Sendo assim, os organocalcogênios contendo Selênio chamam atenção pela ampla gama de efeitos farmacológicos atribuídos geralmente à sua ação sobre o sistema redox (Nogueira *et al.*, 2004).

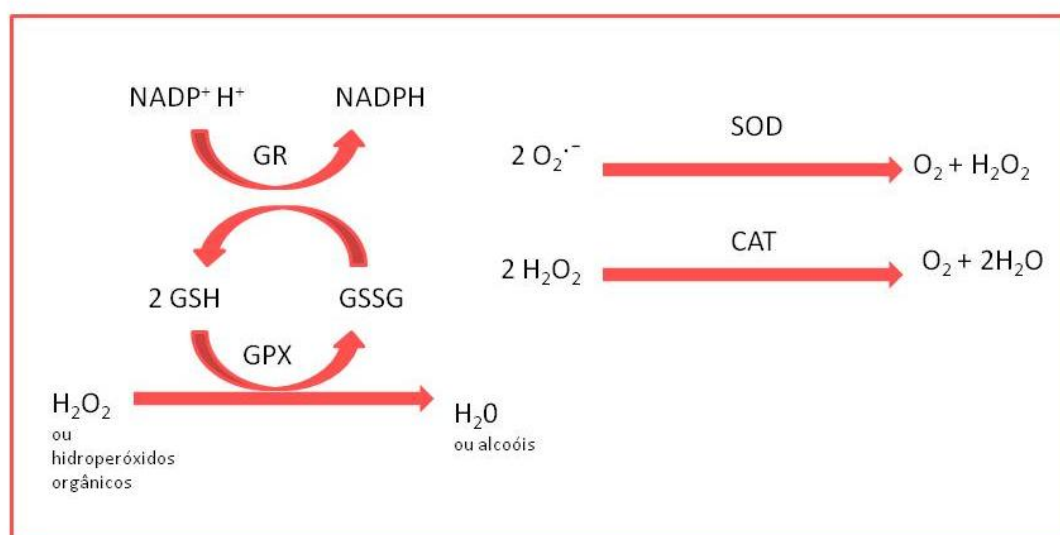


Figura 5: Reações das principais enzimas antioxidantes. Fonte: Própria autora.

## 2.4 Selênio

O Selênio (Se) é um elemento traço essencial na dieta, sendo considerado um micronutriente indispensável para muitos organismos vivos, incluindo humanos, mamíferos e bactérias (Novoselov *et al.*, 2002; Rayman, 2012; Mangiapane *et al.*, 2014). Esse elemento é encontrado em alimentos como a castanha-do-pará, alho, cebola, brócolis, cogumelos, cereais, pescados, ovos e carnes (Dumont *et al.*, 2006). A ingestão diária recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é de 34 mcg/d para adultos. Está localizado no grupo dos calcogênios (grupo 16) na tabela periódica, podendo apresentar-se sob quatro estados de oxidação: selenato ( $\text{Se}^{+6}$ ), selenito ( $\text{Se}^{+4}$ ), selênio elementar ( $\text{Se}^0$ ) e seleneto ( $\text{Se}^{-2}$ ). Papp *et al.* (2007)

Esse calcogênio apresenta um grande número de funções biológicas, melhorando diversas condições patológicas como, por exemplo, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes, câncer, diabetes tipo 2, distúrbios da tireoide e reprodutivo. (Rayman, 2012). O Se exerce sua atividade biológica através da sua incorporação no 21º aminoácido essencial, a selenocisteína (Sec) em uma única classe de proteínas chamadas selenoproteínas (Wang *et al.*, 2011). As selenoproteínas possuem importante papel no processo de detoxificação e de sequestro de EROs (Novoselov *et al.*, 2002). Desta maneira, a função antioxidante do Se é considerada a principal atividade e também a mais importante.

Nos seres humanos, algumas dessas proteínas desempenham um papel fundamental no metabolismo da tireoide e ingestões dietéticas inadequadas são responsáveis por problemas de saúde que estão relacionados com a deficiência de Se, como doenças de Keshan e Kashin-Beck, além disso, alto risco de infecções e desenvolvimento de câncer também já foram descritos (Rayman, 2005; Lu *et al.*, 2016). Sendo assim, o Se possui função em nível de sítio ativo enzimático, além de cofatorial, podendo formar também parte da glutathione peroxidase (GPx), cuja função é a redução de peróxidos (orgânicos e inorgânicos) (Mcmurray e Blanchflower, 1976). Essa função na GPx poderia indicar que o Se provavelmente

interage com qualquer nutriente que afete o balanço redox celular (Navarro-Alarcon e Lopez-Martinez, 2000)

Embora o Se seja bem reconhecido como elemento traço essencial e apresente uma importante função biológica sabe-se que este micronutriente pode ocasionar toxicidade, como por exemplo, na doença alcalina “*alkali disease*”, decorrente da ingestão de plantas seleníferas por animais (Spallholz, 1994). Entre os sintomas descritos estão perda do apetite e depressão que podem progredir para paralisia e morte por insuficiência respiratória. Em seres humanos, níveis tóxicos de Se são responsáveis por causar hálito com odor de alho, perda de cabelo e fraqueza de unhas, má saúde dentária, além de distúrbios nervosos e da pele (Rayman, 2012). O mecanismo pelo qual esse elemento exerce sua toxicidade não está completamente elucidado, vários estudos têm evidenciado que os efeitos tóxicos do Se estão relacionados com a sua habilidade em catalisar a oxidação de tióis endógenos e com a formação de radicais livres (Spallholz, 1994; Barbosa *et al.*, 1998). Dessa forma o Se destaca-se por sua bioquímica única, sua capacidade antioxidante e sua estreita janela terapêutica (Pinto *et al.*, 2011).

#### **2.4.1 Compostos orgânicos de Selênio**

Os compostos orgânicos de Se já foram descritas na literatura por diversas atividades farmacológicas como anti-úlceras, anticâncer, hepato e neuroprotetora (Nogueira *et al.*, 2004; Jesse *et al.*, 2009). Geralmente esses compostos exibem atividade mimética da GPx e decompõem peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos utilizando glutatona reduzida ou outros tióis como doadores de hidrogênio (Nogueira *et al.*, 2004) e por esse fato tornaram-se compostos de grande interesse farmacológico nos últimos anos podendo agir como melhores nucleófilos do que os antioxidantes clássicos (Arteel e Sies, 2001).

Dentro dessa classe o Ebselen (2-fenil-1,2-benzilsoselenazol-3(2H)-ona) (fig. 5), um mimético da enzima GPx (Muller *et al.*, 1985), que apresenta, entre suas diversas atividades farmacológicas descritas, propriedades antiaterogênicas na aterosclerose associada a hiperglicemia em camundongos mutantes apoE -/- (Chew

*et al.*, 2009) e efeito protetor sobre o desenvolvimento de catarata (Aydemir *et al.*, 2012). Recentemente Aydemir *et al.* (2012) demonstrou que o tratamento com Ebselen melhora a aprendizagem espacial e a memória de camundongo em modelo de doença de Alzheimer. Esse composto já está em estudo clínico (fase 2) e recentemente o tratamento com 400mg duas vezes ao dia em 83 participantes demonstrou a segurança e eficácia na prevenção da perda auditiva aguda induzida pelo ruído (Kil *et al.*, 2017).

Outro bom exemplo a ser citado é o disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> (fig. 6) que destaca-se pelas diferentes atividades farmacológicas em diferentes modelos animais. Esse composto já foi relatado por apresentar propriedades anti-úlceras, anti-inflamatória, antinociceptiva, anti-hiperglicêmica e neuroprotetora (Ghisleni *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2006; Savegnago *et al.*, 2006; Savegnago *et al.*, 2007), Também foi descrita sua capacidade de retardar o desenvolvimento de câncer (De Vargas Barbosa *et al.*, 2008).

Nesse contexto podemos sugerir que a atividade antioxidante exibida pelos compostos orgânicos de Se parece ser responsável pela sua eficácia terapêutica em doenças onde o estresse oxidativo participa ativamente para a sua progressão. No entanto, apesar das propriedades farmacológicas, o fato dessas moléculas serem altamente complexas, apresentando mais de uma classe química em sua estrutura, e não uniformes dentre si em relação às suas propriedades físico-químicas, como por exemplo, lipofilicidade, acidez, constante de dissociação e estado físico, há também efeitos toxicológicos (Barbosa *et al.*, 1998; Borges *et al.*, 2005; Avila *et al.*, 2007; De Andrade *et al.*, 2010; Meinerz *et al.*, 2013). A exposição prolongada a altas doses de (PhSe)<sub>2</sub> causa neurotoxicidade em roedores através da inibição da atividade da enzima δ-ALA-D e Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> + ATPase (Nogueira *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2005). Também foi observada a indução de convulsão mediada parcialmente pelo sistema GABAérgico em filhotes ratos tratados com doses elevadas de (PhSe)<sub>2</sub> em exposição aguda (Prigol *et al.*, 2010). Já o Ebselen foi recentemente relatado por exercer um potencial efeito tóxico em células pancreáticas de ratos através do comprometimento do estado oxidativo celular e da secreção enzimática, além de induzir estresse do retículo endoplasmático e ativar proteínas quinases. (Santofimia-Castano *et al.*, 2017). Apesar de não estar completamente elucidado o mecanismo

de toxicidade dos organocalcogênios de Se sabe-se que essas moléculas podem se ligar a grupamentos tióis de enzimas e proteínas causando sua depleção (Nogueira *et al.*, 2004) e afetando assim uma ampla gama de estruturas celulares, tecidos e órgãos.

Efeitos farmacológicos e toxicológicos em *C. elegans* já foram descritos para uma grande variedade de compostos orgânicos de Se. O próprio  $(\text{PhSe})_2$  atenuou o estresse oxidativo induzido pelo peptídeo A $\beta$  num modelo transgênico de doença de Alzheimer, recuperando a memória e a aprendizagem dos nematoides (Zamberlan *et al.*, 2014). Já as propriedades antioxidantes foram demonstradas pelo tratamento com xilofuranosídeos contendo Se frente à toxicidade induzida por Mn através da regulação da via DAF-16/FOXO em *C. elegans*, uma importante via de sinalização envolvida no envelhecimento e no estresse oxidativo (Wollenhaupt *et al.*, 2014). Outros compostos também foram descritos por agirem através da mesma via, como é o caso de cloroquinolinas contendo Se em baixas concentrações, que foram eficazes em reduzir a formação de EROs induzido por paraquat numa exposição aguda, melhorando a sobrevivência e reprodução dos vermes através da regulação de enzimas antioxidantes moduladas por DAF-16/FOXO e SKN-1/Nrf-2 (Avila *et al.*, 2012; Salgueiro *et al.*, 2014; Salgueiro *et al.*, 2017). Contudo, essas moléculas apresentam concentrações letais ( $\text{LD}_{50}$ ) muito baixas, e conseqüentemente uma pequena janela terapêutica, podendo causar toxicidade.

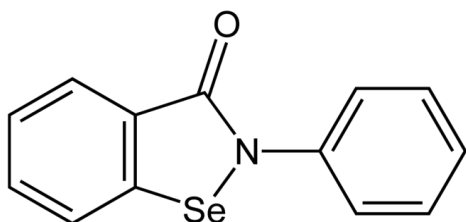


Fig. 5: Estrutura do Ebselen.

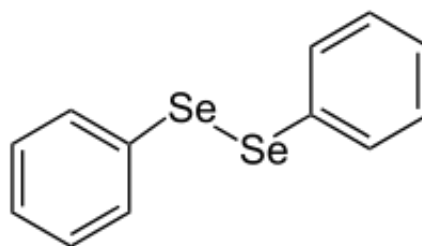


Fig. 6: Estrutura do Disseleneto de Difenila.



## 2.5 Farmacologia dos Heterociclos: Ênfase em 1,2,3-triazóis

Os triazóis são compostos orgânicos heterocíclicos que possuem um anel de cinco membros com três átomos de nitrogênio e dois átomos de carbono que existem em duas formas isoméricas, o 1,2,3-triazol e o 1,2,4-triazol. Esses heterociclos possuem grande importância na química medicinal por apresentarem algumas características atraentes, como a formação de ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e as interações de empilhamento  $\pi$ , o que permite a ligação ao alvo biológico com alta afinidade devido à sua melhor solubilidade (Dheer *et al.*, 2017).

As porções 1,2,3-triazóis são protótipos atraentes, uma vez que oferecem uma elevada estabilidade, mesmo sob forte ambiente oxidativo e redutor e a sua propensão para formar ligações de hidrogênio aumenta a sua solubilidade, favorecendo a ligação a alvos biomoleculares (Dalvie *et al.*, 2002)]. Desta maneira, os derivados de triazol exibem ampla gama de propriedades biológicas através de diferentes mecanismos de ação.

Entre as principais atividades biológicas já descritas, a atividade antitumoral tem ganhado destaque. Recentemente, o 3- (4-(4-fenoxifenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il) benzo [d] isoxazole (PTB) revelou ser um dos agentes antiproliferativos mais potentes com uma  $IC_{50}$  de 2  $\mu$ M contra uma linhagem celular de leucemia mieloide (Ashwini *et al.*, 2015). Da mesma maneira, novos 4-heteroaril-5-aril-(2H)-1,2,3-triazóis foram eficaz contra linhagem celular de câncer de mama Hs578T (Yan *et al.*, 2010). Outra atividade farmacológica de merece destaque é a anti-inflamatória. Kim, T. W. *et al.* (2015) sintetizaram uma serie de fenil-1H-1,2,3-triazóis e avaliou seu potencial anti-inflamatório usando o modelo de edema de orelha induzido por xileno em camundongos. O estudo revelou que um de seus análogos aumentou a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) induzida por  $TNF\alpha$ , sendo comparativamente melhor que o medicamento de referência utilizado, o diclofenaco.

Diversos outros estudos relatam atividades antituberculose, antileishmania, antitripanosoma, antimicrobiana, antiviral, antibacteriana e antimalárica de uma gama de compostos contendo 1,2,3-triazóis (Dheer *et al.*, 2017), demonstrando a importância dessa classe na busca de novas moléculas potencialmente terapêuticas.

Com relação aos heterociclos contendo selênio muitas moléculas já demonstraram também diversas propriedades farmacológicas. Sendo assim, alguns compostos merecem destaque na literatura, por apresentarem efeitos anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico, antioxidante, entre outros (Ninomiya *et al.*, 2011). Entre eles está o Ebselen, como também outros bons candidatos possuem em sua estrutura anéis de cinco membros como o anel 1,2,3-triazol. Por exemplo, o composto 1-(2,5-difenilselenofen-3il)pent-1-in-3-ol, que demonstrou efeitos anticonvulsivantes e antioxidantes em ratos em um modelo de convulsão induzido por pilocarpina através da redução do estresse oxidativo (Wilhelm, Jesse, *et al.*, 2009a). Além disso, possui propriedade hepatoprotetora contra lesões hepáticas induzidas por d-galactosamina e lipopolissarídeo (Wilhelm, Jesse, Roman, *et al.*, 2009). Outro estudo demonstrou a capacidade anti-hiperalgésica e anti-nociceptiva sistêmicas do composto em camundongos onde o efeito anti-hiperalgésico foi mantido por até 6h (Wilhelm, Jesse, *et al.*, 2009b).

## JUSTIFICATIVA

Uma grande variedade de compostos é sintetizada na busca por promissores agentes farmacológicos que possam agir regulando a disfunção redox caracterizada em diversas patologias. Destacam-se os compostos orgânicos de Se e compostos contendo o heterociclo 1,2,3-triazol, já relatados por apresentarem efeitos farmacológicos, principalmente através de suas propriedades antioxidantes. Nesse contexto o uso de um modelo alternativo, especialmente *in vivo*, que reduza o uso de mamíferos e seja facilmente manipulado é de grande interesse, permitindo a investigação da toxicologia e da capacidade farmacológica e antioxidante dessas novas moléculas e através do uso de ferramentas genéticas que permitem verificar possíveis mecanismos ação.

## **OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Avaliar a toxicidade e o potencial antioxidante de uma série de organoselenotriazóis em diferentes condições de estresse mitocondrial em *C. elegans*.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Determinar a toxicidade dos compostos em *C. elegans* através da CL50, longevidade, níveis de tióis não proteicos totais (SHNP);
- Determinar a ação antioxidante dos organoselenotriazóis por meio da quantificação dos níveis de EROs e da atividade enzimática das enzimas SOD e CAT;
- Avaliar a capacidade antioxidante dos compostos organoselenotriazóis frente a agentes de oxidação exógenos, paraquat e peróxido de hidrogênio, pela determinação dos níveis de EROs e da sobrevivência dos vermes;
- Avaliar a capacidade antioxidante protetora dos compostos frente a uma condição de estresse oxidativo mitocondrial causado por mutação no gene *mev-1*, pela análise dos níveis de EROs, da longevidade, da atividade enzimática da SOD e CAT e níveis de tióis não proteicos totais (SHNP).

## MANUSCRITO

### **Arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles attenuate oxidative damage induced by mitochondrial dysfunction in *mev-1 Caenorhabditis elegans* mutants**

Ana Thalita Gonçalves Soares, Luiz Brasil Lopes Rodrigues Junior, Willian Goulart Salgueiro, Ana Helena de Castro Dal Forno, Cristiane Freitas Rodrigues, Jeferson Franco, Manoela do Sacramento Diego Alves, Riva de Paula Oliveira, Simone Pinton, Daiana Ávila

#### **Abstract**

Organic selenium molecules have many described pharmacological activities, such as anti-inflammatory and anti-tumoral, which are mainly due to their antioxidant effects. As they are promising pharmacological agents, their synthesis has grown significantly. Once many new molecules synthesized every day, the use of a simple animal model, such as the *Caenorhabditis elegans*, is highly valuable for initial toxicity and pharmacological potential evaluation of these molecules. The goal of this study was to evaluate the toxicity and the antioxidant capacity of three Arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles in *C. elegans*. The animals were exposed to the molecules in liquid media for 30 minutes at the first larval stage (L1). There were no toxic effects over animals' viability within the range of tested concentrations (1 $\mu$ M-1000  $\mu$ M). Exposure to 10  $\mu$ M of Arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles has partially reversed the stress induced by the pesticide paraquat (1 mM), which is a mitochondrial toxin. Only SeTz-2 (10  $\mu$ M) improved the viability of the animals exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM). The molecules Arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles also improved *mev-1* mutants' lifespan, which is normally decreased by excessive mitochondrial ROS production due to an alteration in a subunit of their mitochondrial complex 2. Also, the molecules were able to reduce ROS levels measured by the fluorescent probe H<sub>2</sub>DCF-DA, as well as they also reduced catalase enzyme' activity. Based on our findings, it is possible to suggest that these molecules have antioxidant activity in *C. elegans*, mainly when facing mitochondrial oxidative stress.

Keywords: *C. elegans*; Selenium; Oxidative stress; Mitochondria.

## Introduction

Oxidative stress is induced by an imbalance of the redox state through the dysfunction in the antioxidant system or by an excessive generation of free radicals, being present in several pathologies such as neurodegenerative, metabolic and cardiovascular diseases (Kim, G. H. *et al.*, 2015; Gaiz *et al.*, 2017). Hence, antioxidant therapy is described as a strategy for the treatment or delay in the development of these diseases.

Mitochondrion is the cellular center for free radical generation due to electron transporter chain, wherein complexes I and III are considered the prime locations for superoxide production. Agents that impair the electron transport chain and/or ATP synthesis have been implicated with the onset of diseases as Parkinson's disease. For instance, the pesticide paraquat has been widely used as a model for PD in different animals, as zebrafish and rodents (Dinis-Oliveira *et al.*, 2006), as it has been demonstrated that brain mitochondria are the major site of free radical production following paraquat exposure (Castello *et al.*, 2007). In agreement, agents that improve mitochondrial function have been shown to exert beneficial effects in animal models and also in patients (Fiskum *et al.*, 2003; Storch, 2007; Storch *et al.*, 2007).

In this context, organic compounds containing selenium have gained attention in the antioxidant therapy research and can complement natural cell defenses against prooxidant agents. Good antioxidants must have high nucleophilicity, a chemical characteristic that is necessary to eliminate free radicals, modulate the antioxidant redox system and low levels of toxicity, which are the main features of some classes of these molecules (Nogueira e Rocha, 2011). Notably, it has been reported that some organoselenium compounds as Ebselen, diphenil diselenide and 3"3-ditrifluoromethyldiphenyl diselenide have protected mitochondria from oxidative damage- induced by different agents (L. Puntel *et al.*, 2015).

In order to screen new potential drugs that successfully treat oxidative stress associated diseases, a model organism model which is feasible for fast, low cost, and reproducible biological activity and toxicity evaluation is desirable. In addition, it allows translatability because of its considerable genetic homology to human genes (Labuschagne e Brenkman, 2013). Previously our group described that two Se and

Te-xylofuranosides modulated the cellular sublocation of FOXO/DAF-16 in *C. elegans*, thus protecting from Mn-induced toxicity (Wollenhaupt *et al.*, 2014). This pathway was also essential for the recovery from oxidative damage induced by paraquat after 4-phenylchalcogenil-7-chloroquinolines, which also demonstrated to interact with the Nrf2/SKN-1 pathway, increasing the expression of *gcs-1*, *sod-3* and *gst-4*, thus improving the stress response in *C. elegans* (Salgueiro *et al.*, 2017). Notably, paraquat and Mn induce mitochondrial damage by increasing ROS production (Abdulwahid Arif e Ahmad Khan, 2010; Avila *et al.*, 2010).

Since synthetic organic Se compounds may represent novel therapeutic targets for the various diseases in which oxidative stress is involved, we sought to evaluate the biological activity and toxicity of a series of arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles (**SeTz**) over the nematode *C. elegans*. A previous study demonstrated that selanyl-1,2,3-triazoles (Alves *et al.*, 2017) depicted antidepressant-like effect mediated, at least partially, via the central dopaminergic and serotonergic neurotransmitter (Donato *et al.*, 2013). Hence, in the present study we aimed to evaluate new selenotriazoles molecules to assess whether they have potential to repair oxidative damage caused by different mitochondrial stress inducers, particularly from a genetic mitochondrial dysfunction (*mev-1* mutation) in *C. elegans*.

## Materials and Methods

### Compounds and chemicals

The compounds 1-benzyl-4-[2-(phenylselanyl)ethyl]-1*H*-1,2,3-triazole (**SeTz-1**), 1-benzyl-4-[3-(phenylselanyl)propyl]-1*H*-1,2,3-triazole (**SeTz-2**) and 4-[(phenylselanyl)methyl]-1-[3-(trifluoromethyl)benzyl]-1*H*-1,2,3-triazole (**SeTz-3**) (Figure 1) were synthesized by copper catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of azidomethyl arylselenides with alkynes according to Seus *et al.* (2012) and were solubilized in DMSO. All other reagents were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) or from local suppliers.

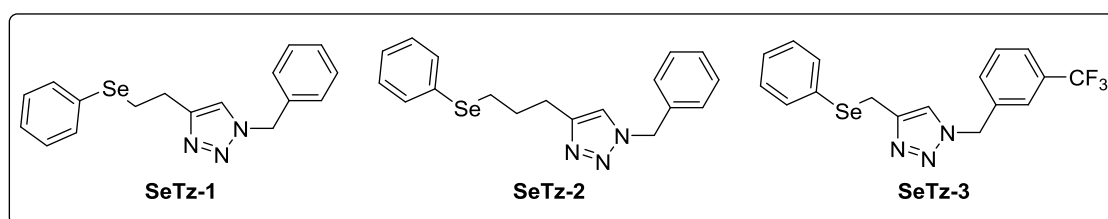


Fig. 1: Derivates 1-(arylseleno-methyl)-1,2,3-triazoles.

### *C. elegans strains and maintenance*

*C. elegans* strains were routinely propagated at 20 °C on Nematode Growth Medium (NGM) plates containing a lawn of *Escherichia coli* strain OP50 as food source. The synchronization was carried out by treatment with sodium hypochlorite in hermaphrodites during the reproductive period (Brenner, 1974). 14 hours later, first larval staged worms (L1) hatched and were then used in the experiments. The following strains were used for this study: N2 Bristol (wildtype) and TK22 [*mev-1(kn1)* III]. All strains were used for the assays outlined below.

### *Determination of lethal concentration 50% (LC<sub>50</sub>)*

Worms (1500) at the first larval stage (L1), previously synchronized as described above, were exposed to the compounds for 30 minutes, in a bacteria-free liquid medium containing 0.5% NaCl. Following treatment, worms were washed three times with 0.5% NaCl solution to remove the compounds and then transferred to NGM plates with *E. coli* as food source. We used various concentrations (1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM and 1000 µM) to determine the LC<sub>50</sub> based on the worms survival rate 24h after the exposure.

### *Lifespan Assay*

After the acute exposure to compounds, 20 live and healthy-looking worms were collected at the same day at the late L4 stage and transferred daily (during the reproductive period) to new plates NGM seeded with OP50 in order to prevent contamination or progeny. Worms were transferred every two days after reproductive period. Survival was assessed daily until all the worms were dead.

### *Stress- resistance assays*

#### a) Chemical Stress

To evaluate the protective potential of the compounds against toxic agents we used the pesticide paraquat and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). We exposed N2 worms at L1 stage to paraquat (Gramoxone 200®-1mM) or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM) for 30 minutes, in a bacteria-free liquid medium containing 0.5% NaCl. Right after the washes to remove the toxicants, worms were exposed to the compounds as stated previously, then



washed off to remove the compounds and finally placed on plates with *E. Coli* OP50. The survival and other parameters outlined in sequence have been assessed 48 hours after exposures.

#### b) Genetic stress-model

For this type of stress we have used *mev-1* mutants, which present abnormal energy metabolism and increased sensitivity to oxidative stress, thus resulting in shortened lifespan. Hence, we treated these worms as previously described for N2. 48hs following exposure, 20 healthy looking worms were transferred to new plates and lifespan was followed.

#### *Determination of Reactive Oxygen Species (ROS) in vivo*

The intracellular levels of ROS was measured using 2'7'diclorofluoresceín-diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) (Sigma) according to Shi *et al.* (2012) with modifications. 48 hours after the treatments described above, worms at the fourth larval stage (L4) were washed three times with water to remove the bacteria then incubated with 50 µM of 2'7'diclorofluoresceín-diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) for 1h. Subsequently, worms were washed with water twice and transferred to 96-well microplate. Fluorescence levels were measured (excitation: 485nm and emission: 535 mm) using a microplate reader Spectramax M5 Molecular Device. Fluorescence measurements were normalized by protein quantified according to Bradford (1976).

#### *SOD and catalase activities assays*

Activity of the enzyme superoxide dismutase was measured according to Boveris (1984), with some adaptations. 5000 worms were treated and allowed to reach the L4 stage, then washed with M9 buffer for bacteria removal. Samples were subsequently frozen and thawed 3 times and then sonicated using a lysis buffer (10mM tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1mM EDTA), centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes at 4 °C and the different volumes of supernatant were used for determination of epinephrine oxidation curve. To determine the activity of catalase, degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was monitored as described by. Data were normalized for protein measurement according Bradford (1976).

#### *Determination of non-proteic thiol groups (NPSH) levels*

The quantification of NPSH was conducted according to Ellman (1959). 48h following treatment, 2000 worms were washed from the NGM plates with M9 buffer, frozen and thawed 3 times, and then sonicated and centrifuged for 10 minutes at 12,000 rpm (4 °C). After precipitating protein content (TCA 25%) from the samples, DTNB (2mM) and Tris HCl (1M) were added to a 96-well plate with the samples. A standard curve of L-cysteine was used as reference and all samples were read at 412nm. The data normalized by the amount of protein (Bradford, 1976).

### *Statistical Analysis*

All experiments were repeated at least 3 times in duplicates. For survival, we performed a dose-response curve and plotted a sigmoidal dose response curve using nonlinear regression followed by a Bonferroni post hoc test. For longevity assays, the curves were plotted and repeated measures ANOVA was performed. For the other analysis one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey test was performed. For all the experiments, the effects of compounds treatment were compared to untreated controls assayed in parallel. P values <0.05 were considered statistically significant. In all figures, error bars represent the standard error of the mean.

## **Results**

### *Arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles have low toxicity*

Initially we evaluated the survival of the worms against several arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles concentrations (1-1000  $\mu$ M) to determine their toxicity. The concentrations here employed did not significantly induce mortality, then it was not possible to determine the lethal concentration 50% ( $EC_{50}$ ) (Fig. 2). The concentration of 10  $\mu$ M was then used for the following tests based on previous studies (Salgueiro *et al.*, 2014; Wollenhaupt *et al.*, 2014). Figure 3A shows that these concentrations were not able to influence the survival of nematode and does not affect the formation of ROS determined by  $H_2DCF$ -DA fluorescence (Fig. 3B). We also found that worms lifespan (Fig 2C) and the levels of non-proteic thiols (Fig. 3D) were not affected by any of the compounds at concentration of 10  $\mu$ M .

### *Arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles partially reverse the damage induced by paraquat and $H_2O_2$*

Paraquat (1 mM), a potent pro-oxidant agent capable of inducing oxidative stress through increased superoxide anion production, caused a significant reduction in worms survival upon exposure. However, treatment with **SeTz 1-3** partially rescued this effect (Fig. 4A). Although, none of the molecules was able to reduce ROS formation induced by paraquat treatment (Fig. 4B).

To verify whether another source of stress would elicit distinct responses in the nematodes we have used H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 mM), which significantly affected the worms survival. However, in this condition only compound **SeTz-2** partially rescued from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- induced mortality (Fig. 5A). Likewise, when paraquat was used, the compounds did not reduce the increased ROS formation following exposure (Fig. 5B).

#### *Arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles reduce ROS associated deleterious effects in a genetic model of oxidative stress*

To observe whether the animals would react against an endogenous source of ROS we used a *mev-1* knockout mutant, which has a reduced lifespan due to exacerbated production of ROS in mitochondria by incomplete reduction of O<sub>2</sub> in the electron transporter chain. The worms treated with the different organic compounds showed a significant increase in lifespan when compared to the control group. In addition, compounds **SeTz-2** and **SeTz-3** were able to increase the lifespan at the level of N2 (wild type) nematodes, which were used as control strain (Fig. 6A). Additionally, the same compounds that depicted better effect on longevity (**SeTz-2** and **SeTz-3**), significantly reduced the production of ROS in *mev-1* mutants (Fig 6B).

#### *Arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles modulate catalase enzyme activity*

We also assayed the activity of the enzymes superoxide dismutase and catalase and observed that *mev-1* mutants show an increase in CAT activity. The compounds significantly reduced the CAT activity in the mutants *mev-1* worms. However, SOD activity was not significantly altered (Fig. 7A and B). In addition, we have imaged SOD::GFP and CAT-1,2, 3::GFP worms and we did not observe any alteration in these protein levels following treatment with these molecules (data not shown).

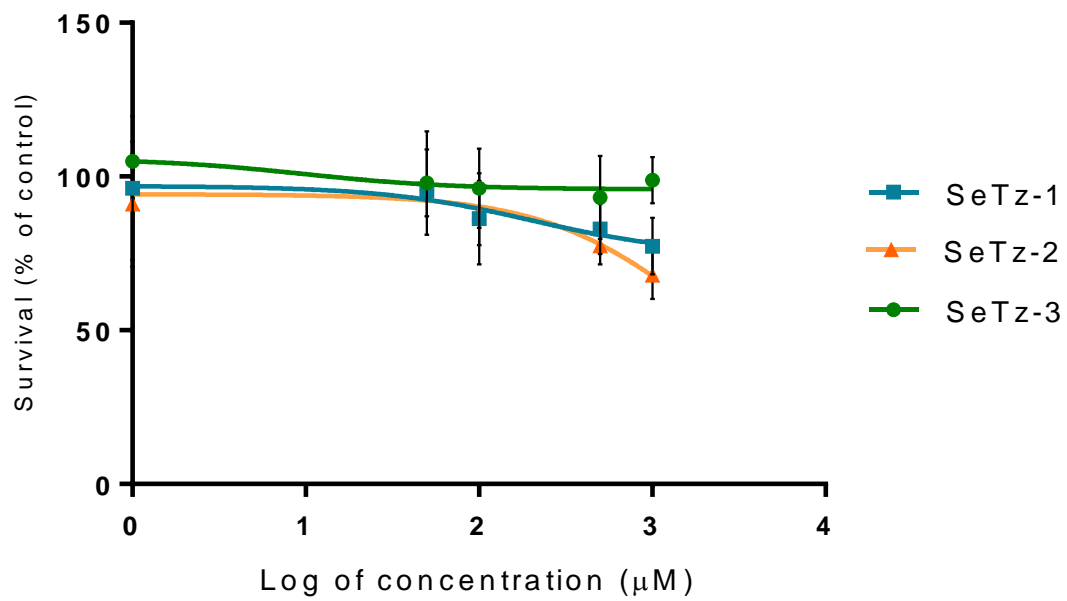
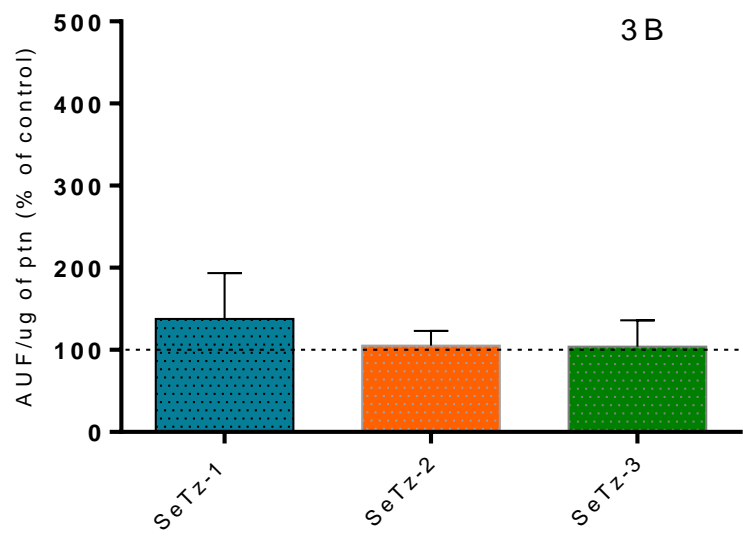
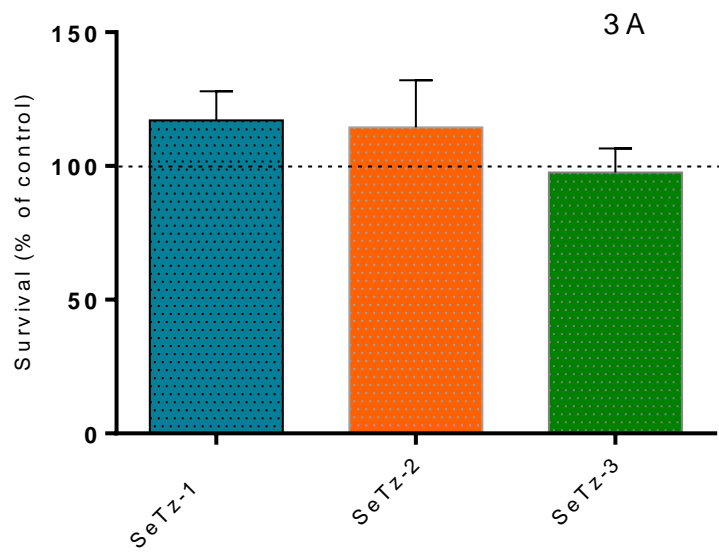


Fig. 2: Dose response curve for arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles in *C. elegans*. Concentrations are represented as log of µM for better plotting.



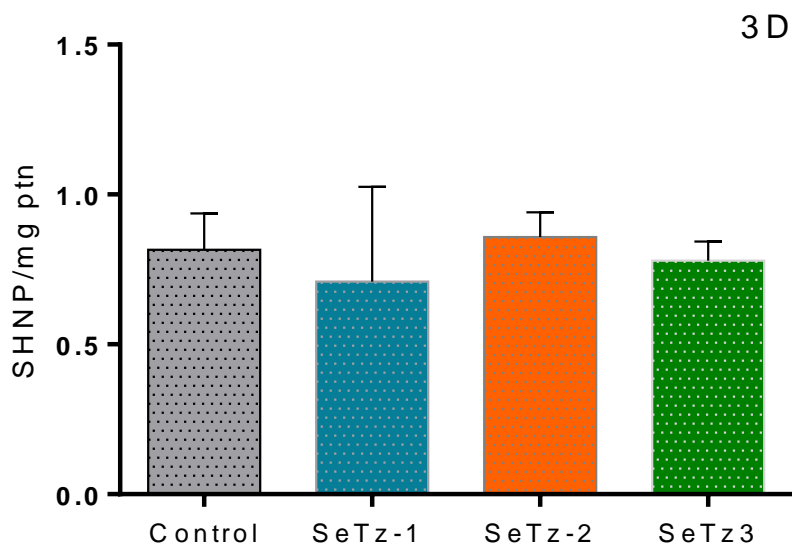
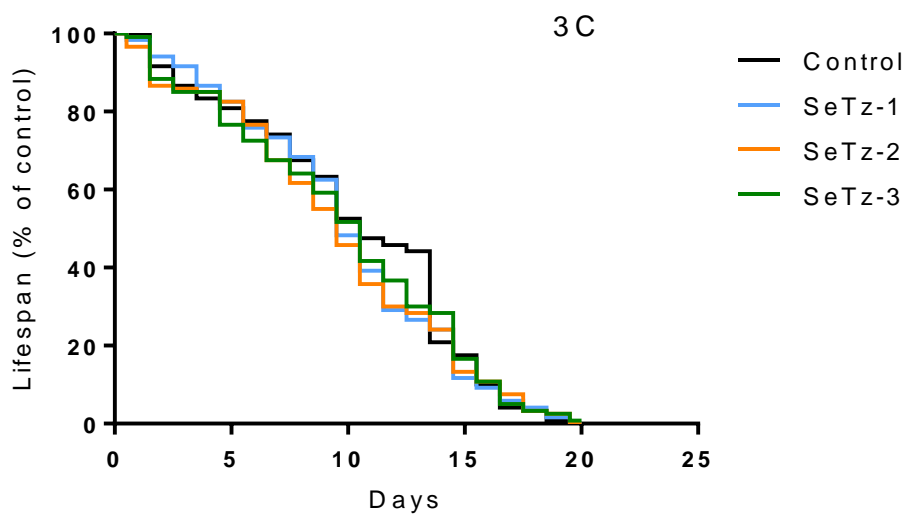


Fig. 3: Per se effect of arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles. A) non-lethal concentration of 10  $\mu$ M on survival. Data were normalized to 100%. B) ROS levels measured with H<sub>2</sub>DCF-DA probe. Data were normalized to 100%. C) Lifespan. D) Non-protein thiols. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* indicates significant difference compared to the control group (dashed line).

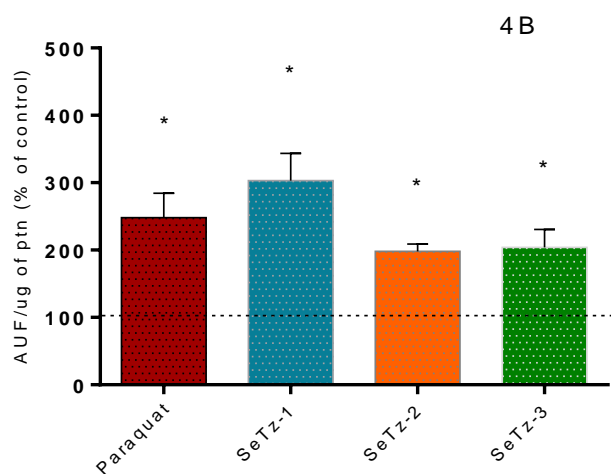
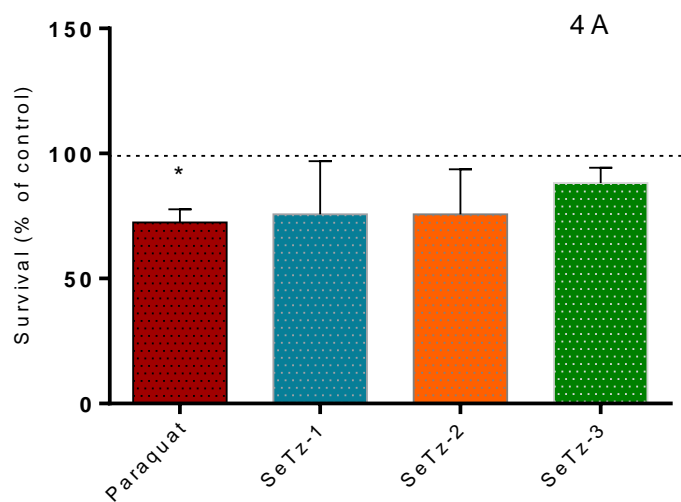


Fig 4: Paraquat reversion treatments with arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles compounds. A) non-lethal concentration of 10  $\mu$ M on survival. B) ROS levels measured with H<sub>2</sub>DCF-DA probe. Data were normalized to 100% Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* indicates significant difference compared to the control group (dashed line).

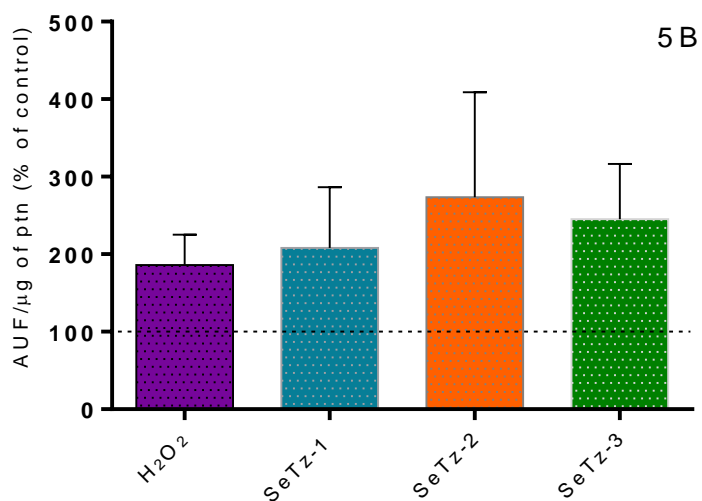
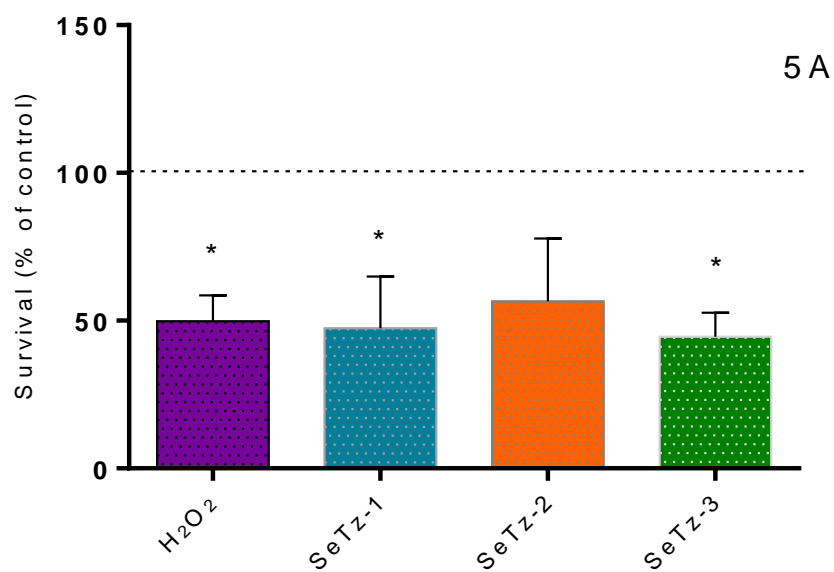
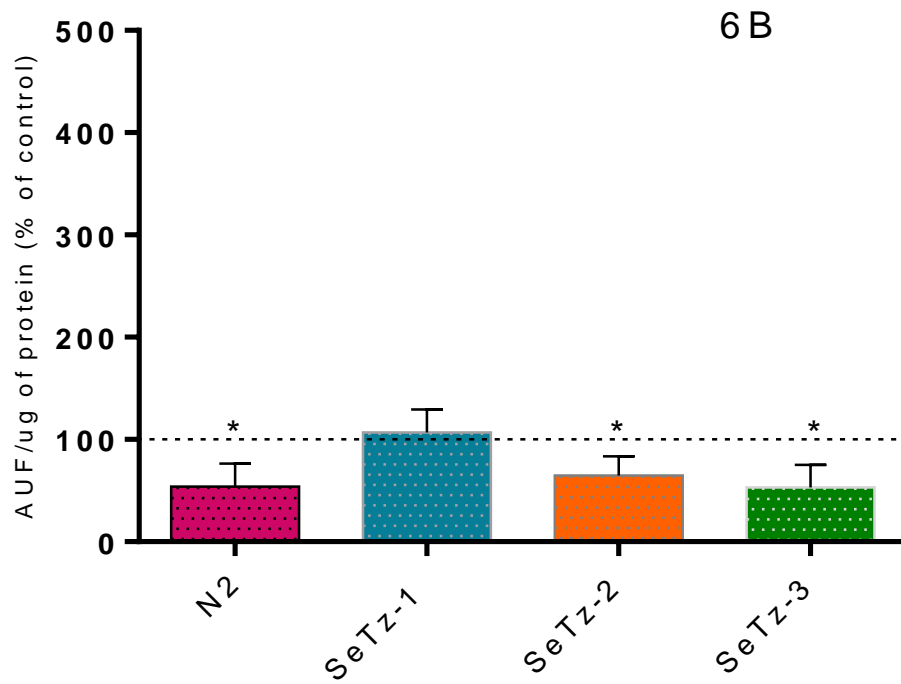
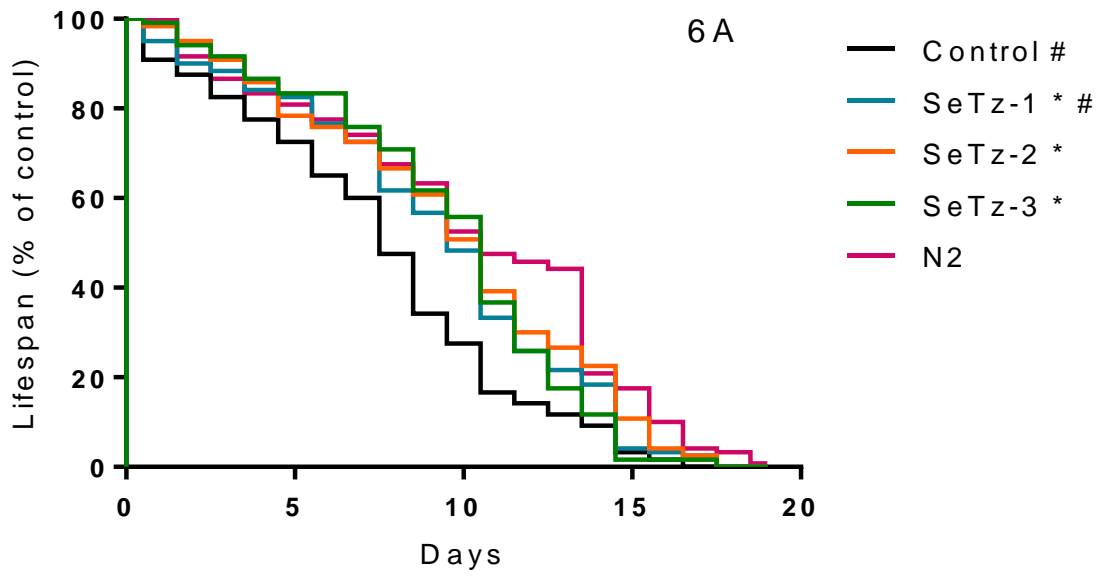


Fig. 5: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reversion treatments with arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles compounds. A) non-lethal concentration of 10 μM on survival. B) ROS levels measured with H<sub>2</sub>DCF-DA probe. Data were normalized to 100% Data are expressed as mean ± SEM.





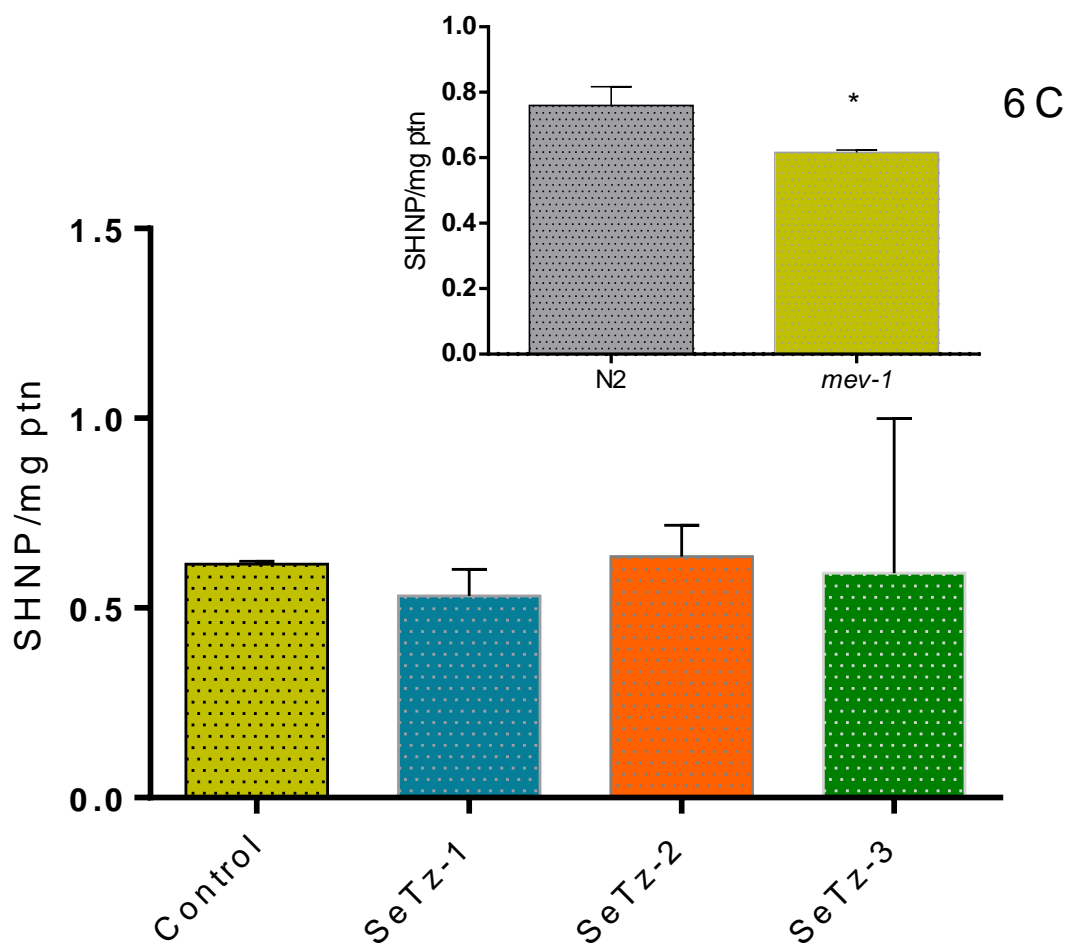


Fig. 6: *mev-1* mutants treated with arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles compounds. A) Lifespan. B) ROS levels measured with H2DCF-DA probe. C) Non-protein thiols. Data were normalized to 100% Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* indicates significant difference compared to the control group. # indicates significant difference compared to the control N2 (wild-type).

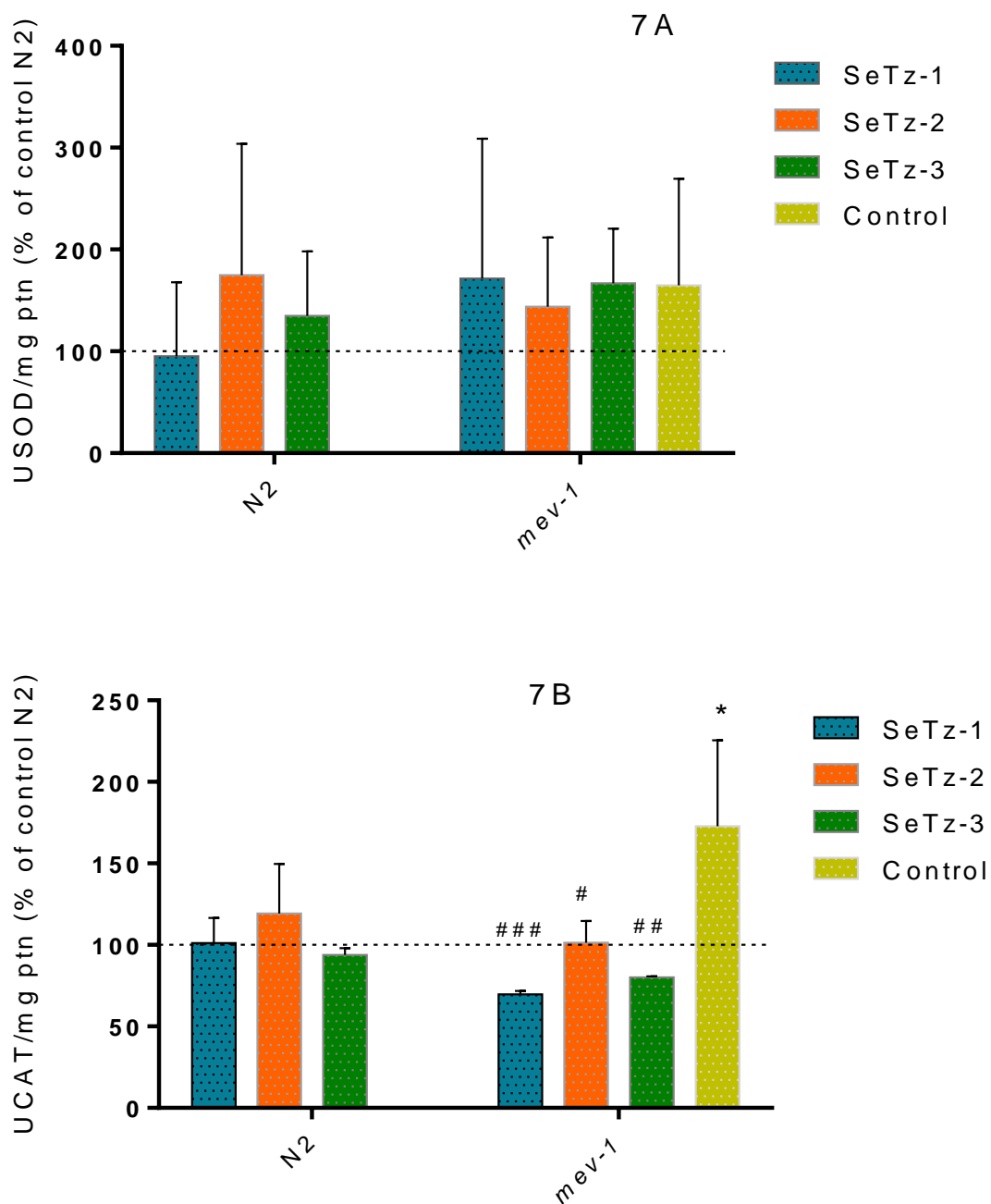


Fig. 7: Activity enzymes in *mev-1* mutants treatments with arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles compounds. A) Superoxide dismutase. B) Catalase. Data were normalized to 100% Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* indicates significant difference compared to the control N<sub>2</sub> (wild-type) group. # indicates significant difference compared to the control *mev-1*.

## Discussion

Organic selenium compounds containing heterocycles in their structures have been highlighted in the literature for their wide pharmacological functions attributed mainly to the antioxidant capacity. This potential has been characterized in different models, as is the case of Ebselen, which has anticancer, hepatoprotective, neuroprotective and anti-depressant properties, just to name a few (Satoh *et al.*, 2004; Posser *et al.*, 2009). This class of selenyl-1,2,3-triazoles demonstrated antidepressant-like effect mediated, at least partially, via the central dopaminergic and serotonergic neurotransmitter systems (Donato *et al.*, 2013). Based on the promising effects of these selenyl-1,2,3-triazoles we decided to verify the toxicity in worms and then investigate their potential in stress resistance against different mitochondrial stressors of new arylselenyl-alkyl-1,2,3-triazoles in the nematode *C. elegans*.

Initially, we have evaluated the effects of the compounds *per se* over wild-type animals in order to ascertain whether the compounds were toxic *per se* to the worms. According to the dose-response survival curve, the compounds showed no toxicity at the concentrations here tested (Fig. 2). This was a surprising result based on previous studies using the same experimental model, where different molecules had greatly differences between their LC<sub>50</sub> values, but all depicted measurable toxicity (Salgueiro *et al.*, 2014; Wollenhaupt *et al.*, 2014; Salgueiro *et al.*, 2017).

We proceeded toxicity assessment through longevity and oxidative stress of worms acutely exposed to the 10  $\mu$ M concentration of each compound (Fig. 3). The compounds did not affect any of the evaluated parameters *per se*, including ROS formation, which was determined using the fluorescent probe 2'7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA). The molecular mechanism by which organic selenium compounds induce toxicity and oxidative stress is not well established, however, the interaction between selenium and thiols plays a central role in molecular toxicity (Orlan e Toppo, 2014; Grey, 2017). Indeed, thiol oxidation is known to contribute to the production of ROS, mediating toxicity by directly or indirectly damage to biomolecules (Jernstrom *et al.*, 1993; Nogueira e Rocha, 2011). As levels of non-protein thiols were not altered by treatment with arylselenyl-alkyl-1,2,3-triazoles (Fig. 3D) we can suggest that the compounds are not capable of interacting with thiol groups and therefore do not present toxicity for wild-type worms.

Next, we sought to evaluate these molecules ability to repair the oxidative damage inflicted in *C. elegans* by two well known prooxidant agents, paraquat and hydrogen peroxide. According to our results, arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles did not reduce ROS formation induced by pre-treatment with neither paraquat nor hydrogen peroxide (Fig. 4B and 5B). We also evaluated ROS levels immediately after treatment (L1) and no reduction was observed in animals exposed to arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles (data not shown). Notably, there was a partial rescue of this effect in the survival parameter, especially when the stressor agent was paraquat, a mitochondrial toxicant (Fig. 4A and 5A). This may suggest that arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles may be more active against superoxide anions produced in the mitochondria by paraquat than against hydrogen peroxide. Indeed, it has been already shown that *C. elegans sod-3* may be upregulated after acute exposure to non-lethal concentrations of an organic selenium compound, where CTL-2 (hydrogen peroxide detoxifying enzyme) involvement was not observed (Salgueiro *et al.*, 2017). Also, there are literature records for organic selenium compounds that may mimic superoxide dismutase activity *in vitro* (Nogueira *et al.*, 2004), however, the same has not been reported for catalase.

Hence, taking advantage of one of the main features of *C. elegans*, which is the easy availability of transgenic strains, we employed *mev-1* mutants. These animals have a dysfunction of succinate dehydrogenase enzyme of the mitochondrial respiratory chain and, consequently, have an abnormal energy metabolism with increased sensitivity to oxidative stress, resulting in higher ROS levels and elevated ROS-mediated damage contributing to shortened lifespan (Yu *et al.*, 2014; Fong *et al.*, 2017). Indeed, we have observed reduced lifespan as well as reduced thiols groups in these mutants, which reassures their disturbed oxidative metabolism (Fig. 6C-insert). The arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles compounds were able to improve *mev-1* reduced lifespan when compared to the control group. In addition, **SeTz-2** and **SeTz-3** treated worms depicted lifespans that were indistinguishable from wild-type worms, thus indicating that these compounds totally recovered the shortened lifespan induced by oxidative stress (Fig 6A). This effect is possibly due to the reduction in ROS formation (Fig 6B). As a consequence, the increased catalase activity in *mev-1* mutants was reduced by compounds treatment (Fig 7B). Hence we believe that the compound may act differently according to the

stress condition, thus acting as scavenger at high levels of ROS, reducing the need for antioxidant enzymes (CAT and SOD). The increased CAT activity in *mev-1* worms may be a compensatory response to the high production of ROS, which might be a major cause of their reduced lifespan, as it is broadly reported in the literature (Dancy *et al.*, 2014; Schaar *et al.*, 2015). We suggest that exposure to compounds neutralized ROS production by decreasing the need for the exacerbated use of antioxidant defenses, such as catalase, thus causing an increase in longevity. Increased lifespan may be linked to decreased oxidative stress in *C. elegans* (Honda *et al.*, 2010) and other organisms (Finkel e Holbrook, 2000). As previously stated, arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles compounds may be more efficient against superoxide anions than against hydrogen peroxide, which would in turn explain why catalase activity seems to be decreased (Fig. 7A), once it would be not necessary in the absence of its precursor, the superoxide anion.

Here we demonstrated that new arylselanyl-alkyl-1,2,3-triazoles can protect against an specific mitochondrial stressor, the *mev-1* mutation, and that the most putative mechanism is by scavenging activity, as the molecular targets SOD and CAT were not modified by these molecules.

## References

- Abdulwahid Arif, I., Ahmad Khan, H., 2010. Environmental toxins and Parkinson's disease: putative roles of impaired electron transport chain and oxidative stress. *Toxicol Ind Health* 26, 121-128.
- Avila, D.S., Colle, D., Gubert, P., Palma, A.S., Puntel, G., Manarin, F., Noremborg, S., Nascimento, P.C., Aschner, M., Rocha, J.B., Soares, F.A., 2010. A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. *Toxicol Sci* 115, 194-201.
- Boveris, A., 1984. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 105, 429-435.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Castello, P.R., Drechsel, D.A., Patel, M., 2007. Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. *J Biol Chem* 282, 14186-14193.
- Dancy, B.M., Sedensky, M.M., Morgan, P.G., 2014. Effects of the mitochondrial respiratory chain on longevity in *C. elegans*. *Exp Gerontol* 56, 245-255.
- Dinis-Oliveira, R.J., Remiao, F., Carmo, H., Duarte, J.A., Navarro, A.S., Bastos, M.L., Carvalho, F., 2006. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. *Neurotoxicology* 27, 1110-1122.
- Donato, F., de Gomes, M.G., Goes, A.T., Seus, N., Alves, D., Jesse, C.R., Savegnago, L., 2013. Involvement of the dopaminergic and serotonergic systems in the antidepressant-like effect caused by 4-phenyl-1-(phenylselanylmethyl)-1,2,3-triazole. *Life Sci* 93, 393-400.
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.
- Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Fiskum, G., Starkov, A., Polster, B.M., Chinopoulos, C., 2003. Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991, 111-119.
- Fong, S., Ng, L.F., Ng, L.T., Moore, P.K., Halliwell, B., Gruber, J., 2017. Identification of a previously undetected metabolic defect in the Complex II *Caenorhabditis elegans* mev-1 mutant strain using respiratory control analysis. *Biogerontology* 18, 189-200.
- Gaiz, A., Mosawy, S., Colson, N., Singh, I., 2017. Thrombotic and cardiovascular risks in type two diabetes; Role of platelet hyperactivity. *Biomed Pharmacother* 94, 679-686.
- Grey, D., 2017. Tellurium : properties, uses, and research.
- Honda, Y., Tanaka, M., Honda, S., 2010. Redox regulation, gene expression and longevity. *Geriatr Gerontol Int* 10 Suppl 1, S59-69.
- Jernstrom, B., Morgenstern, R., Moldeus, P., 1993. Protective role of glutathione, thiols, and analogues in mutagenesis and carcinogenesis. *Basic Life Sci* 61, 137-147.
- Kim, G.H., Kim, J.E., Rhie, S.J., Yoon, S., 2015. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol* 24, 325-340.
- L. Puntel, R., Avila, D., H. Roos, D., Pinton, S., 2015. Mitochondrial Effects of Organoselenium and Organotellurium Compounds.
- Labuschagne, C.F., Brenkman, A.B., 2013. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging. *Ageing Res Rev* 12, 918-930.
- Nogueira, C.W., Rocha, J.B., 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* 85, 1313-1359.
- Nogueira, C.W., Zeni, G., Rocha, J.B., 2004. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104, 6255-6285.
- Orian, L., Toppo, S., 2014. Organochalcogen peroxidase mimetics as potential drugs: a long story of a promise still unfulfilled. *Free Radic Biol Med* 66, 65-74.

Posser, T., Kaster, M.P., Barauna, S.C., Rocha, J.B., Rodrigues, A.L., Leal, R.B., 2009. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Eur J Pharmacol* 602, 85-91.

Salgueiro, W.G., Goldani, B.S., Peres, T.V., Miranda-Vizuete, A., Aschner, M., da Rocha, J.B.T., Alves, D., Avila, D.S., 2017. Insights into the differential toxicological and antioxidant effects of 4-phenylchalcogenil-7-chloroquinolines in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 110, 133-141.

Salgueiro, W.G., Xavier, M.C.D.F., Duarte, L.F.B., Câmara, D.F., Fagundez, D.A., Soares, A.T.G., Perin, G., Alves, D., Avila, D.S., 2014. Direct synthesis of 4-organylsulfenyl-7-chloroquinolines and their toxicological and pharmacological activities in *Caenorhabditis elegans*. *European Journal of Medicinal Chemistry* 75, 448-459.

Satoh, T., Ishige, K., Sagara, Y., 2004. Protective effects on neuronal cells of mouse afforded by ebselen against oxidative stress at multiple steps. *Neurosci Lett* 371, 1-5.

Schaar, C.E., Dues, D.J., Spielbauer, K.K., Machiela, E., Cooper, J.F., Senchuk, M., Hekimi, S., Van Raamsdonk, J.M., 2015. Mitochondrial and cytoplasmic ROS have opposing effects on lifespan. *PLoS Genet* 11, e1004972.

Seus, N., Saraiva, M.T., Alberto, E.E., Savegnago, L., Alves, D., 2012. Selenium compounds in Click Chemistry: copper catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of azidomethyl arylselenides and alkynes. *Tetrahedron* 68, 10419-10425.

Shi, Y.C., Yu, C.W., Liao, V.H., Pan, T.M., 2012. Monascus-fermented dioscorea enhances oxidative stress resistance via DAF-16/FOXO in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 7, e39515.

Storch, A., 2007. [Coenzyme Q10 in Parkinson's disease. Symptomatic or neuroprotective effects?]. *Nervenarzt* 78, 1378-1382.

Storch, A., Jost, W.H., Vieregge, P., Spiegel, J., Greulich, W., Durner, J., Muller, T., Kupsch, A., Henningsen, H., Oertel, W.H., Fuchs, G., Kuhn, W., Niklowitz, P., Koch, R., Herting, B., Reichmann, H., 2007. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial on symptomatic effects of coenzyme Q(10) in Parkinson disease. *Arch Neurol* 64, 938-944.

Wollenhaupt, S.G.N., Soares, A.T., Salgueiro, W.G., Noremberg, S., Reis, G., Viana, C., Gubert, P., Soares, F.A., Affeldt, R.F., Lüdtke, D.S., Santos, F.W., Denardin, C.C., Aschner, M., Avila, D.S., 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.

Yu, C.W., Wei, C.C., Liao, V.H., 2014. Curcumin-mediated oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, akt-1, pdk-1, osr-1, unc-43, sek-1, skn-1, sir-2.1, and mev-1. *Free Radic Res* 48, 371-379.



## CONCLUSÕES

- Os organoselenotriazóis testados não apresentaram toxicidade nos nematoides tratados;
- Os compostos protegeram parcialmente os vermes do dano oxidativo induzido pelo paraquat e pelo peróxido de hidrogênio, revertendo parcialmente a mortalidade induzida pelos agentes oxidantes;
- Os compostos foram capazes de aumentar a longevidade dos vermes com fonte endógena de EROs no modelo genético, além de reduzirem os níveis de EROs e a atividade da CAT.

## **PERSPECTIVAS**

Considerando os resultados obtidos nesse estudo e o efeito antidepressivo semelhante em camundongo já relatado para uma classe semelhante (selanil-1,2,3-triazoles), trabalhos posteriores podem ser direcionados para avaliar se os compostos orgânicos selenotriazóis possuem efeito farmacológico neuroprotetor em modelos de doenças neurodegenerativas, bem como buscar elucidar o mecanismo de ação dessas moléculas.

## REFERÊNCIAS

- ABDULWAHID ARIF, I.; AHMAD KHAN, H. Environmental toxins and Parkinson's disease: putative roles of impaired electron transport chain and oxidative stress. **Toxicol Ind Health**, v. 26, n. 2, p. 121-8, Mar 2010. ISSN 1477-0393 (Electronic) 0748-2337 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20207656> >.
- ALVES, D. et al. Copper Catalysis and Organocatalysis Showing the Way: Synthesis of Selenium-containing Highly Functionalized 1,2,3-Triazoles. **Chem Rec**, Dec 13 2017. ISSN 1528-0691 (Electronic) 1528-0691 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29235236> >.
- ARTEEL, G. E.; SIES, H. The biochemistry of selenium and the glutathione system. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 153-158, 2001. ISSN 1382-6689. Disponível em: < [//www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668901000783](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668901000783) >.
- ASHWINI, N. et al. Synthesis of 1,2-benzisoxazole tethered 1,2,3-triazoles that exhibit anticancer activity in acute myeloid leukemia cell lines by inhibiting histone deacetylases, and inducing p21 and tubulin acetylation. **Bioorg Med Chem**, v. 23, n. 18, p. 6157-65, Sep 15 2015. ISSN 1464-3391 (Electronic) 0968-0896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26299825> >.
- AVILA, D. S. et al. Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 9, p. 1903-10, May 01 2012. ISSN 1873-4596 (Electronic) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22406322> >.
- AVILA, D. S. et al. A possible neuroprotective action of a vinylic telluride against Mn-induced neurotoxicity. **Toxicol Sci**, v. 115, n. 1, p. 194-201, May 2010. ISSN 1096-0929 (Electronic) 1096-0929 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20133376> >.
- AVILA, D. S. et al. A biochemical and toxicological study with diethyl 2-phenyl-2-tellurophenyl vinylphosphonate in a sub-chronic intraperitoneal treatment in mice. **Life Sci**, v. 80, n. 20, p. 1865-72, Apr 24 2007. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17383683> >.
- AYDEMIR, O. et al. Protective effects of ebselen on sodium-selenite-induced experimental cataract in rats. **J Cataract Refract Surg**, v. 38, n. 12, p. 2160-6, Dec 2012. ISSN 1873-4502 (Electronic) 0886-3350 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22999516> >.
- BARBOSA, N. B. et al. Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: possible relationship with oxidative stress. **Chem Biol Interact**, v. 163, n. 3, p. 230-8, Nov 07 2006. ISSN 0009-2797 (Print) 0009-2797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16965767> >.

BARBOSA, N. B. et al. Effect of organic forms of selenium on delta-aminolevulinatase dehydratase from liver, kidney, and brain of adult rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 149, n. 2, p. 243-53, Apr 1998. ISSN 0041-008X (Print) 0041-008X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9571994> >.

BICKERS, D. R.; ATHAR, M. Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. **J Invest Dermatol**, v. 126, n. 12, p. 2565-75, Dec 2006. ISSN 1523-1747 (Electronic) 0022-202X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108903> >.

BORGES, V. C.; ROCHA, J. B.; NOGUEIRA, C. W. Effect of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen on cerebral Na(+), K(+)-ATPase activity in rats. **Toxicology**, v. 215, n. 3, p. 191-7, Nov 15 2005. ISSN 0300-483X (Print) 0300-483X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16095793> >.

BOVERIS, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 429-35, 1984. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6328196> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0016063911&partnerID=40&md5=c6817c9e6c8894090c16bfbe86240ed8> >.

BURGOYNE, J. R. et al. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. **Circ Res**, v. 111, n. 8, p. 1091-106, Sep 28 2012. ISSN 1524-4571 (Electronic) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23023511> >.

CASTELLO, P. R.; DRECHSEL, D. A.; PATEL, M. Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. **J Biol Chem**, v. 282, n. 19, p. 14186-93, May 11 2007. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389593> >.

CHEW, P. et al. Site-specific antiatherogenic effect of the antioxidant ebselen in the diabetic apolipoprotein E-deficient mouse. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 29, n. 6, p. 823-30, Jun 2009. ISSN 1524-4636 (Electronic) 1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325139> >.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*. **WormBook**, p. 1-31, Jun 18 2015. ISSN 1551-8507 (Electronic) 1551-8507 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26087236> >.

CULETTO, E.; SATTELLE, D. B. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 6, p. 869-77, Apr 12 2000. ISSN 0964-6906 (Print) 0964-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10767309> >.

DALVIE, D. K. et al. Biotransformation reactions of five-membered aromatic heterocyclic rings. **Chem Res Toxicol**, v. 15, n. 3, p. 269-99, Mar 2002. ISSN 0893-228X (Print) 0893-228X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11896674> >.

DANCY, B. M.; SEDENSKY, M. M.; MORGAN, P. G. Effects of the mitochondrial respiratory chain on longevity in *C. elegans*. **Exp Gerontol**, v. 56, p. 245-55, Aug 2014. ISSN 1873-6815 (Electronic) 0531-5565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24709342> >.

DE ANDRADE, R. B. et al. Inhibition of creatine kinase activity by 3-butyl-1-phenyl-2-(phenyltelluro)oct-en-1-one in the cerebral cortex and cerebellum of young rats. **J Appl Toxicol**, v. 30, n. 6, p. 611-6, Aug 2010. ISSN 1099-1263 (Electronic) 0260-437X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20809551> >.

DE VARGAS BARBOSA, N. B. et al. Diphenyl diselenide supplementation delays the development of N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors. **Arch Toxicol**, v. 82, n. 9, p. 655-63, Sep 2008. ISSN 0340-5761 (Print) 0340-5761 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18074119> >.

DHEER, D.; SINGH, V.; SHANKAR, R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: Current developments. **Bioorg Chem**, v. 71, p. 30-54, Apr 2017. ISSN 1090-2120 (Electronic) 0045-2068 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28126288> >.

DINIS-OLIVEIRA, R. J. et al. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 27, n. 6, p. 1110-22, Dec 2006. ISSN 0161-813X (Print) 0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16815551> >.

DONATO, F. et al. Involvement of the dopaminergic and serotonergic systems in the antidepressant-like effect caused by 4-phenyl-1-(phenylselanylmethyl)-1,2,3-triazole. **Life Sci**, v. 93, n. 9-11, p. 393-400, Sep 17 2013. ISSN 1879-0631 (Electronic) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23911670>  
[http://ac.els-cdn.com/S0024320513004256/1-s2.0-S0024320513004256-main.pdf?\\_tid=9141042e-cde5-11e6-b2ed-00000aab0f6c&acdnat=1483029835\\_0e9e5760121cf00589775043b0d55615](http://ac.els-cdn.com/S0024320513004256/1-s2.0-S0024320513004256-main.pdf?_tid=9141042e-cde5-11e6-b2ed-00000aab0f6c&acdnat=1483029835_0e9e5760121cf00589775043b0d55615)  
[http://ac.els-cdn.com/S0024320513004256/1-s2.0-S0024320513004256-main.pdf?\\_tid=9ebbc31e-cde5-11e6-9c1d-00000aab0f02&acdnat=1483029857\\_23ad4989a1031dd8a24a4b2fff70993a](http://ac.els-cdn.com/S0024320513004256/1-s2.0-S0024320513004256-main.pdf?_tid=9ebbc31e-cde5-11e6-9c1d-00000aab0f02&acdnat=1483029857_23ad4989a1031dd8a24a4b2fff70993a) >.

DUMONT, E.; VANHAECKE, F.; CORNELIS, R. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, n. 7, p. 1304-23, Aug 2006. ISSN 1618-2642 (Print) 1618-2642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16830114> >.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-7, May 1959. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13650640> >.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-47, Nov 09 2000. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11089981>  
<http://www.nature.com/nature/journal/v408/n6809/pdf/408239a0.pdf> >.

FISKUM, G. et al. Mitochondrial mechanisms of neural cell death and neuroprotective interventions in Parkinson's disease. **Ann N Y Acad Sci**, v. 991, p. 111-9, Jun 2003. ISSN 0077-8923 (Print)  
0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12846980> >.

FONG, S. et al. Identification of a previously undetected metabolic defect in the Complex II *Caenorhabditis elegans mev-1* mutant strain using respiratory control analysis. **Biogerontology**, v. 18, n. 2, p. 189-200, Apr 2017. ISSN 1573-6768 (Electronic)  
1389-5729 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28039571> >.

GAIZ, A. et al. Thrombotic and cardiovascular risks in type two diabetes; Role of platelet hyperactivity. **Biomed Pharmacother**, v. 94, p. 679-686, Aug 05 2017. ISSN 1950-6007 (Electronic)  
0753-3322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28787703> >.

Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2012-8, Dec 11 1998. ISSN 0036-8075 (Print)  
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9851916> >.

GEORGIEVA, E. et al. Mitochondrial Dysfunction and Redox Imbalance as a Diagnostic Marker of "Free Radical Diseases". **Anticancer Res**, v. 37, n. 10, p. 5373-5381, Oct 2017. ISSN 1791-7530 (Electronic)  
0250-7005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28982845> >.

GHISLENI, G. et al. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immuncontent. **Brain Res**, v. 986, n. 1-2, p. 196-9, Oct 03 2003. ISSN 0006-8993 (Print)  
0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12965245> >.

GIORGIO, M. et al. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 9, p. 722-8, Sep 2007. ISSN 1471-0080 (Electronic)  
1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17700625> >.

GREY, D. **Tellurium : properties, uses, and research.** 2017. ISBN 9781536105551 1536105554.

GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 9-10, p. 922-35, Nov 1999. ISSN 0891-5849 (Print)  
0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10569625> >.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1147-50, Nov 2007. ISSN 0300-5127 (Print)  
0300-5127 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17956298> >.

HODJAT, M.; REZVANFAR, M. A.; ABDOLLAHI, M. A systematic review on the role of environmental toxicants in stem cells aging. **Food Chem Toxicol**, v. 86, p. 298-308, Dec 2015. ISSN 1873-6351 (Electronic)  
0278-6915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26582272> >.

HONDA, Y.; TANAKA, M.; HONDA, S. Redox regulation, gene expression and longevity. **Geriatr Gerontol Int**, v. 10 Suppl 1, p. S59-69, Jul 2010. ISSN 1447-0594 (Electronic)  
1447-0594 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20590843>  
<http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1447-0594.2010.00591.x/asset/j.1447-0594.2010.00591.x.pdf?v=1&t=j865tfco&s=5d201f70eab58f08f72af1ef753c9179541abe15> >.

JERNSTROM, B.; MORGENSTERN, R.; MOLDEUS, P. Protective role of glutathione, thiols, and analogues in mutagenesis and carcinogenesis. **Basic Life Sci**, v. 61, p. 137-47, 1993. ISSN 0090-5542 (Print)  
0090-5542 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8304926> >.

JESSE, C. R.; SAVEGNAGO, L.; NOGUEIRA, C. W. Mechanisms involved in the antinociceptive and anti-inflammatory effects of bis selenide in mice. **J Pharm Pharmacol**, v. 61, n. 5, p. 623-30, May 2009. ISSN 0022-3573 (Print)  
0022-3573 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19406001> >.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: C. elegans as a model organism. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 5, p. 387-98, May 2006. ISSN 1474-1776 (Print)  
1474-1776 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672925> >.

KIL, J. et al. Safety and efficacy of ebselen for the prevention of noise-induced hearing loss: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. **Lancet**, v. 390, n. 10098, p. 969-979, Sep 2 2017. ISSN 1474-547X (Electronic)  
0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28716314> >.

KIM, G. H. et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Exp Neurobiol**, v. 24, n. 4, p. 325-40, Dec 2015. ISSN 1226-2560 (Print)  
1226-2560 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26713080> >.

KIM, T. W. et al. Synthesis and biological evaluation of phenyl-1H-1,2,3-triazole derivatives as anti-inflammatory agents. **Bioorg Chem**, v. 59, p. 1-11, Apr 2015. ISSN 1090-2120 (Electronic)  
0045-2068 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25658192> >.

L. PUNTEL, R. et al. **Mitochondrial Effects of Organoselenium and Organotellurium Compounds**. 2015. 198-210 Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/133477/article> >.

LABUSCHAGNE, C. F.; BRENKMAN, A. B. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in Caenorhabditis elegans and other model organism of aging. **Ageing Res Rev**, v. 12, n. 4, p. 918-30, Sep 2013. ISSN 1872-9649 (Electronic)  
1568-1637 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080227> >.

LI, J. M. et al. Effects of hydrogen peroxide on mitochondrial gene expression of intestinal epithelial cells. **World J Gastroenterol**, v. 8, n. 6, p. 1117-22, Dec 2002. ISSN 1007-9327 (Print)

1007-9327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12439937> >.

LU, J. et al. Cancer chemoprevention research with selenium in the post-SELECT era: Promises and challenges. **Nutr Cancer**, v. 68, n. 1, p. 1-17, 2016. ISSN 1532-7914 (Electronic)

0163-5581 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26595411> >.

MANGIAPANE, E.; PESSIONE, A.; PESSIONE, E. Selenium and selenoproteins: an overview on different biological systems. **Curr Protein Pept Sci**, v. 15, n. 6, p. 598-607, 2014. ISSN 1875-5550 (Electronic)

1389-2037 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24910086> >.

MARROCCO, I.; ALTIERI, F.; PELUSO, I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, p. 6501046, 2017. ISSN 1942-0994 (Electronic)

1942-0994 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28698768> >.

MCMURRAY, C. H.; BLANCHFLOWER, W. J. The levels of selenium and glutathione peroxidase activity in blood of sheep, cows and pigs. **Res Vet Sci**, v. 20, n. 2, p. 229-31, Mar 1976. ISSN 0034-5288 (Print)

0034-5288 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1265365> >.

MEINERZ, D. F. et al. Sub-acute administration of (S)-dimethyl 2-(3-(phenyltellanyl) propanamido) succinate induces toxicity and oxidative stress in mice: unexpected effects of N-acetylcysteine. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 182, Dec 2013. ISSN 2193-1801 (Electronic).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23658858> >.

MULLER, A.; GABRIEL, H.; SIES, H. A novel biologically active selenoorganic compound-IV. Protective glutathione-dependent effect of PZ 51 (ebselen) against ADP-Fe induced lipid peroxidation in isolated hepatocytes. **Biochem Pharmacol**, v. 34, n. 8, p. 1185-9, Apr 15 1985. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3994741> >.

NAVARRO-ALARCON, M.; LOPEZ-MARTINEZ, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. **Sci Total Environ**, v. 249, n. 1-3, p. 347-71, Apr 17 2000. ISSN 0048-9697 (Print)

0048-9697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10813463> >.

NINOMIYA, M.; GARUD, D. R.; KOKETSU, M. Biologically significant selenium-containing heterocycles. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 255, n. 23, p. 2968-2990, 2011/12/01/ 2011. ISSN 0010-8545. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0010854511001949> >.

NOGUEIRA, C. W. et al. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, v. 183, n. 1-3, p. 29-37, Feb 01 2003. ISSN 0300-483X (Print)

0300-483X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504340> >.



NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Arch Toxicol**, v. 85, n. 11, p. 1313-59, Nov 2011. ISSN 1432-0738 (Electronic)

0340-5761 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720966>  
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00204-011-0720-3> >.

NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chem Rev**, v. 104, n. 12, p. 6255-85, Dec 2004. ISSN 0009-2665 (Print)

0009-2665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15584701>  
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr0406559> >.

NOVOSELOV, S. V. et al. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. **EMBO J**, v. 21, n. 14, p. 3681-93, Jul 15 2002. ISSN 0261-4189 (Print)

0261-4189 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110581> >.

ORIAN, L.; TOPPO, S. Organochalcogen peroxidase mimetics as potential drugs: a long story of a promise still unfulfilled. **Free Radic Biol Med**, v. 66, p. 65-74, Jan 2014. ISSN 1873-4596 (Electronic)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499840> >.

PAPP, L. V. et al. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 7, p. 775-806, Jul 2007. ISSN 1523-0864 (Print)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508906> >.

POSSER, T. et al. Antidepressant-like effect of the organoselenium compound ebselen in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. **Eur J Pharmacol**, v. 602, n. 1, p. 85-91, Jan 05 2009. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19026628> >.

PRIGOL, M. et al. Diphenyl diselenide-induced seizures in rat pups: possible interaction with GABAergic system. **Neurol Res**, v. 32, n. 9, p. 1002-8, Nov 2010. ISSN 1743-1328 (Electronic)

0161-6412 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20433775> >.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clin Interv Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-36, 2007. ISSN 1176-9092 (Print)

1176-9092 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18044138> >.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal**, v. 24, n. 5, p. 981-90, May 2012. ISSN 1873-3913 (Electronic)

0898-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286106> >.

RAYMAN, M. P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. **Proc Nutr Soc**, v. 64, n. 4, p. 527-42, Nov 2005. ISSN 0029-6651 (Print)

0029-6651 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16313696> >.

\_\_\_\_\_. Selenium and human health. **Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256-68, Mar 31 2012. ISSN 1474-547X (Electronic)  
0140-6736 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22381456> >.

SALGUEIRO, W. G. et al. Insights into the differential toxicological and antioxidant effects of 4-phenylchalcogenil-7-chloroquinolines in *Caenorhabditis elegans*. **Free Radic Biol Med**, v. 110, p. 133-141, Sep 2017. ISSN 1873-4596 (Electronic)  
0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28571752> >.

SALGUEIRO, W. G. et al. Direct synthesis of 4-organylsulfenyl-7-chloro quinolines and their toxicological and pharmacological activities in *Caenorhabditis elegans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 448-459, 2014. ISSN 0223-5234. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S022352341400083X> >.

SANTOFIMIA-CASTANO, P. et al. Ebselen impairs cellular oxidative state and induces endoplasmic reticulum stress and activation of crucial mitogen-activated protein kinases in pancreatic tumour AR42J cells. **J Cell Biochem**, Jul 13 2017. ISSN 1097-4644 (Electronic)  
0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28703940> >.

SATOH, T.; ISHIGE, K.; SAGARA, Y. Protective effects on neuronal cells of mouse afforded by ebselen against oxidative stress at multiple steps. **Neurosci Lett**, v. 371, n. 1, p. 1-5, Nov 16 2004. ISSN 0304-3940 (Print)  
0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15500956> >.

SAVEGNAGO, L. et al. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. **Eur J Pharmacol**, v. 555, n. 2-3, p. 129-38, Jan 26 2007. ISSN 0014-2999 (Print)  
0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17123507> >.

SAVEGNAGO, L. et al. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 21, n. 1, p. 86-92, Jan 2006. ISSN 1382-6689 (Print)  
1382-6689 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21783643> >.

SCHAAR, C. E. et al. Mitochondrial and cytoplasmic ROS have opposing effects on lifespan. **PLoS Genet**, v. 11, n. 2, p. e1004972, Feb 2015. ISSN 1553-7404 (Electronic)  
1553-7390 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25671321>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4335496/pdf/pgen.1004972.pdf> >.

SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Mol Cell**, v. 48, n. 2, p. 158-67, Oct 26 2012. ISSN 1097-4164 (Electronic)  
1097-2765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23102266> >.

SEUS, N. et al. Selenium compounds in Click Chemistry: copper catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition of azidomethyl arylselenides and alkynes. **Tetrahedron**, v. 68, n. 51, p. 10419-10425, 2012. ISSN 0040-4020. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040402012010903> >.

SHAYE, D. D.; GREENWALD, I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e20085, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21647448> >.

SHI, Y. C. et al. Monascus-fermented dioscorea enhances oxidative stress resistance via DAF-16/FOXO in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**, v. 7, n. 6, p. e39515, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic)

1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22745774>  
< <http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0039515&type=printable> >.

SPALLHOLZ, J. E. On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. **Free Radic Biol Med**, v. 17, n. 1, p. 45-64, Jul 1994. ISSN 0891-5849 (Print)

0891-5849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7959166> >.

STORCH, A. [Coenzyme Q10 in Parkinson's disease. Symptomatic or neuroprotective effects?]. **Nervenarzt**, v. 78, n. 12, p. 1378-82, Dec 2007. ISSN 0028-2804 (Print)

0028-2804 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17508194> >.

STORCH, A. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial on symptomatic effects of coenzyme Q(10) in Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 64, n. 7, p. 938-44, Jul 2007. ISSN 0003-9942 (Print)

0003-9942 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17502459> >.

UZMA, N.; KUMAR, B. S.; PRIYADARSINI, K. I. Hepatoprotective, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of selenocystine in experimental liver injury of rats. **Biol Trace Elem Res**, v. 142, n. 3, p. 723-34, Sep 2011. ISSN 1559-0720 (Electronic)

0163-4984 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20737246> >.

WANG, R. et al. Dietary selenium influences pancreatic tissue levels of selenoprotein W in chickens. **J Inorg Biochem**, v. 105, n. 9, p. 1156-60, Sep 2011. ISSN 1873-3344 (Electronic)

0162-0134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708100> >.

WILHELM, E. A. et al. Anticonvulsant and antioxidant effects of 3-alkynyl selenophene in 21-day-old rats on pilocarpine model of seizures. **Brain Res Bull**, v. 79, n. 5, p. 281-7, Jun 30 2009a. ISSN 1873-2747 (Electronic)

0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19480988> >.

\_\_\_\_\_. Antinociceptive and anti-allodynic effects of 3-alkynyl selenophene on different models of nociception in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 93, n. 4, p. 419-25, Oct 2009b. ISSN 1873-5177 (Electronic)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538987> >.

WILHELM, E. A. et al. Hepatoprotective effect of 3-alkynyl selenophene on acute liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide. **Exp Mol Pathol**, v. 87, n. 1, p. 20-6, Aug 2009. ISSN 1096-0945 (Electronic)

0014-4800 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19344711> >.

WOLLENHAUPT, S. G. N. et al. Seleno- and Telluro-xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. **Food and Chemical Toxicology**, v. 64, p. 192-199, 2014. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513007928> >.

YAN, S. J. et al. An efficient one-pot synthesis of heterocycle-fused 1,2,3-triazole derivatives as anti-cancer agents. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 20, n. 17, p. 5225-8, Sep 01 2010. ISSN 1464-3405 (Electronic) 0960-894X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655212> >.

YU, C. W.; WEI, C. C.; LIAO, V. H. Curcumin-mediated oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, akt-1, pdk-1, osr-1, unc-43, sek-1, skn-1, sir-2.1, and mev-1. **Free Radic Res**, v. 48, n. 3, p. 371-9, Mar 2014. ISSN 1029-2470 (Electronic) 1029-2470 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24313805> >.

ZAMBERLAN, D. C. et al. Diphenyl-diselenide suppresses amyloid-beta peptide in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, v. 278, p. 40-50, Oct 10 2014. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25130558> >.