



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
CAMPUS URUGUAIANA – RS**

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS CONTRA A PARALISIA E EFEITOS
DELETÉRIOS EM MODELO DE ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA EM
*Caenorhabditis elegans***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA HELENA DE CASTRO DAL FORNO

URUGUAIANA, MARÇO, 2017.

ANA HELENA DE CASTRO DAL FORNO

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS CONTRA PARALISIA E EFEITOS
DELETÉRIOS EM MODELO DE ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA EM
*Caenorhabditis elegans***

Orientadora: Prof. Dra. Daiana Silva de Ávila

*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.*

Uruguiana

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) .

D532a Dal Forno, Ana Helena de Castro
AVALIAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS CONTRA A PARALISIA E
EFEITOS DELETÉRIOS EM MODELO DE ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA
EM *Caenorhabditis elegans* / Ana Helena de Castro Dal Forno.
66 p.

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

"Orientação: Daiana Silva de Ávila".

1. Esclerose lateral amiotrófica. 2. *Caenorhabditis*
elegans. 3. trealose. 4. vitamina E. 5. organocompostos. I.
Título.



**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES COMPOSTOS CONTRA A PARALISIA E EFEITOS
DELETÉRIOS EM MODELO DE ESCLEROSE LATERAL AMIOTRÓFICA EM
*Caenorhabditis elegans***

Ana Helena de Castro Dal Forno

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

Defendida e aprovada em 17 de março de 2017.

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Daiana Silva de Ávila

Profª. Drª. Priscila Goubert

Profª. Drª. Simone Pinton

“Will tribal knowledge survive this millennium?

If it doesn’t, the world will be far poorer for its loss”

(Cox, 2000).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e meus amados Pais, Delci João e Ana Maria pela oportunidade, pelo apoio emocional e financeiro durante esta nova formação, sem vocês nada disso seria possível, obrigada por tudo. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Rafael e Antônio, minhas cunhadas Tione e Carol, e aos sobrinhos e afilhados lindos que eles me deram, João Rafael e Anthony.

A UNIPAMPA, pela formação gratuita e de qualidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de uma bolsa de estudos com a qual possível dedicação exclusiva ao mestrado.

A minha Orientadora, Professora Dr^a Daiana Ávila, que sempre se mostrou muito atenciosa, obrigada pela paciência, auxílio, amizade e também experiência e sabedoria.

A minha co-orientadora, Professora Dr^a Cristiane Denardin, obrigada pela ajuda e parceria.

A todos os colegas do Laboratório GBToxCe, que se fizeram presentes na minha vida, acadêmica e pessoal, durante essa jornada, em especial Ana Thalita, Andréia, Cristiane, Daiandra, Eugênia, Fabrine, Hodara, Liliana, Mariani, Jean, Willian, Maurício que foram mais que colegas, foram amigos e confidentes, sem vocês teria sido bem diferente, obrigada pela amizade gratuita.

As queridas amigas que fiz em 2016 e tornaram-se parte do meu dia-a-dia, as fiéis mosqueteiras Andréa, Camila, Mari, Pati e Roseana, obrigada pelo apoio.

Às queridas amigas de infância Gina, Josiane e Maria Carolina, que mesmo de longe sempre se fizeram presentes.

RESUMO

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença paralisante e fatal caracterizada por degeneração e morte dos neurônios motores que é geralmente fatal dentro de cinco anos após diagnóstico e sem tratamento eficaz atual. Aproximadamente 10% dos casos de ELA são familiares (ELAf) e cerca de 20% de ELAf estão associados a mutações no gene superóxido dismutase 1 (*sod1*). Em busca de modelos experimentais alternativos que possam substituir e oferecer novas possibilidades de ensaio de toxicidade xenobiótica, o nematóide *Caenorhabditis elegans* foi considerado favorável como um valioso organismo bioindicador. Utilizando cepas transgênicas de *C. elegans* como modelo ELA HA2619, HA2622, HA2425, HA2426 testamos diferentes compostos para avaliar sua eficácia nas alterações resultantes da mutação em modelo da ELA. Foram testados trealose (5 mM) com vitamina E (200 µg/mL) e os compostos orgânicos (1 µM) 4-fenilselanil-7-cloroquinolina (PSQ) e 4-feniltellanil-7-cloroquinolina (PTQ). Nenhum dos tratamentos testados apresentou resultados positivos para o aumento da longevidade ou diminuição na paralisia, o que nos levou a questionar se os tratamentos podem ter desencadeado um aumento dos sintomas e conseqüentemente uma piora nos vermes. Também observamos que o tratamento com os compostos orgânicos contra o dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio (0,6 mM) não foi revertido. Em nossas perspectivas, mais estudos são necessários para encontrar terapias que podem prolongar a longevidade e diminuir ou retardar a paralisia.

Palavras-chaves: esclerose lateral amiotrófica, trealose, vitamina E, organocompostos, *Caenorhabditis elegans*

ABSTRACT

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal paralytic disorder characterized by degeneration of motoneuron which is generally fatal within five years of diagnosis and with no current effective treatment. Approximately 10% of the ALS cases are familial ALS (fALS) and about 20% of fALS are associated with mutations in the superoxide dismutase 1 gene (*sod1*). Seeking for alternative experimental models that may substitute and offer new possibilities to assay xenobiotics toxicity, the nematode *Caenorhabditis elegans* has been found favorable as a valuable bioindicator organism. Using *C. elegans* transgenic strains as ALS model HA2619, HA2622, HA2425, HA2426 we tested compounds to evaluate the efficacy in treatment of ALS. Trehalose (5mM) with vitamin E (200µg/mL) and the organocompounds (1µM) 4-phenylselanyl-7-chloroquinoline (PSQ) and 4-phenyltellanyl-7-chloroquinoline (PTQ) were tested. None of the treatments tested positive for increased longevity or delayed or decreased paralysis, which led us to wonder if the treatments may have triggered an increase in symptoms and worsening of the worms. We also observed the treatment with the organocompounds against the oxidative damage caused by hydrogen peroxide (0.6mM) was not reversed. In our perspectives further studies are needed to find therapies that may prolong longevity and decrease or delay paralysis.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, trehalose, vitamin E, organocompounds, *Caenorhabditis elegans*

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi desenvolvida em 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 Neuroscience Research.

PARTE TRÊS

Nessa parte encontra-se o Anexo A, artigo desenvolvido em paralelo durante o Mestrado, submetido e aceito pelo periódico Arabian Journal of Chemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão Bibliográfica

Figura I: Ilustração de neurônios.....	15
Figura II: Estrutura química do riluzol.....	17
Figura III: Estrutura química do alfa-tocoferol.....	19
Figura IV: Estrutura química da trealose.....	20
Figura V: Estrutura química dos organocompostos de selênio e telúrio.....	21
Figura VI: Ciclo de vida do <i>C.elegans</i>	24

Artigo Científico

Figure 1: Analysis of the transgenic strains <i>per se</i>	33
Figure 2: Analysis of the treatment with trehalose and vitamin E.....	36
Figure 3: Survival assay with organocompounds.....	37
Figure 4: Survival assay with organocompounds and hydrogen peroxide.....	38
Figure 5: Lifespan of worms treated with organocompounds.....	40
Figure 6: Paralysis assay of worms treated with organocompounds.....	41

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
PARTE UM	
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Esclerose Lateral Amiotrófica.....	15
2.2. Terapias no tratamento da Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)	17
2.2.1. Riluzol	17
2.2.2. α -tocoferol (vitamina E).....	18
2.2.3. Trealose	19
2.2.4. Compostos de selênio (Se) e telúrio (Te)	20
2.3. <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo para o estudo da ELA.....	22
3. JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	26
4.1. OBJETIVO GERAL	26
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
PARTE DOIS	
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	27
6. CONCLUSÕES	45

7. PERSPECTIVAS	46
-----------------------	----

REFERÊNCIAS.....	47
------------------	----

PARTE TRÊS

ANEXO A - Artigo submetido e aceito pela revista Arabian Journal of Chemistry.....	55
--	----

PARTE UM

1. INTRODUÇÃO

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas por morte neuronal excessiva e prematura em regiões focais do cérebro, levando o paciente a uma debilidade motora e algumas vezes cognitiva (AZBILL et al., 1997). Dentre estas doenças está a Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA).

A ELA é uma doença degenerativa do sistema nervoso central, evolutiva e irreversível, que afeta os corpos celulares dos neurônios motores e suas vias no cérebro e na medula espinhal. Quando eles se degeneram, como na ELA, a capacidade do cérebro de iniciar e controlar o movimento muscular é perdida, mas as funções cognitivas e a inteligência são preservadas (LINDEN Jr, 2012). A prevalência de ELA é de 0,4 a 2,4 casos por 100.000 pessoas no mundo inteiro (OMS, 2010). Em 5 a 10 % das pessoas com ELA, a doença é herdada como um traço dominante autossômico, e é referenciada como ELA Familiar (ELAf). Entretanto, em 90 a 95% das pessoas com ELA, não há histórico familiar da doença, denominando-se ELA esporádica (ELAs), onde a causa ainda não é completamente determinada, mas os estudos têm mostrado associação entre vários fatores genéticos individuais e ambientes externos (LINDEN Jr, 2012). Sendo a ELA uma doença degenerativa de rápida progressão, torna-se necessário criar formas alternativas de terapia.

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o radical hidroxila (\bullet OH), o ânion radical superóxido ($O_2 \bullet^-$) e a hidroperoxila ($ROO\bullet$), causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas (SOHAL e WEINDRUCH, 1996; VAN RAAMSDONK e HEKIMI, 2009). As EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos. A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (por ex., superóxido

dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides entre outros.

Atualmente, há apenas um único tratamento para ELA, o Rilutek® 50mg. Não se sabe qual o mecanismo de ação pelo qual ele age, e sim apenas algumas hipóteses. Portanto, é importante que agentes terapêuticos que ajam impedindo que os danos oxidativos da doença progridam, sejam investigados. E escolhemos testar a trealose juntamente com a vitamina E, além de compostos orgânicos de selênio e telúrio para analisar seu potencial na melhora da paralisia e outros efeitos deletérios nas mutações que são modelo da ELA.

Em virtude do fato que a maioria dos testes com novos agentes terapêuticos contra a ELA sejam bastante incipientes, é importante que se façam estudos em animais experimentais antes dos estudos clínicos. Por este motivo, a expansão da utilização de modelos alternativos ao uso de mamíferos em toxicologia e farmacologia experimental é essencial, otimizando o processo de *screening* de novas drogas. Por esta razão, utilizamos o nematoide *Caenorhabditis elegans* como modelo experimental, devido a sua fácil manipulação, alta reprodutibilidade e possibilidade de desenvolvimento de cepas mutantes e transgênicas, marcadas com proteínas fluorescentes.

Tendo em vista o exposto acima, nossa hipótese foi que a administração de algum dos compostos como a trealose, vitamina E, compostos de selênio e telúrio podem acarretar em retardo da progressão da ELA, aumentando a expectativa e a qualidade de vida dos animais. Entretanto, nenhum destes compostos demonstrou atividades promissoras em todos os ensaios realizados.

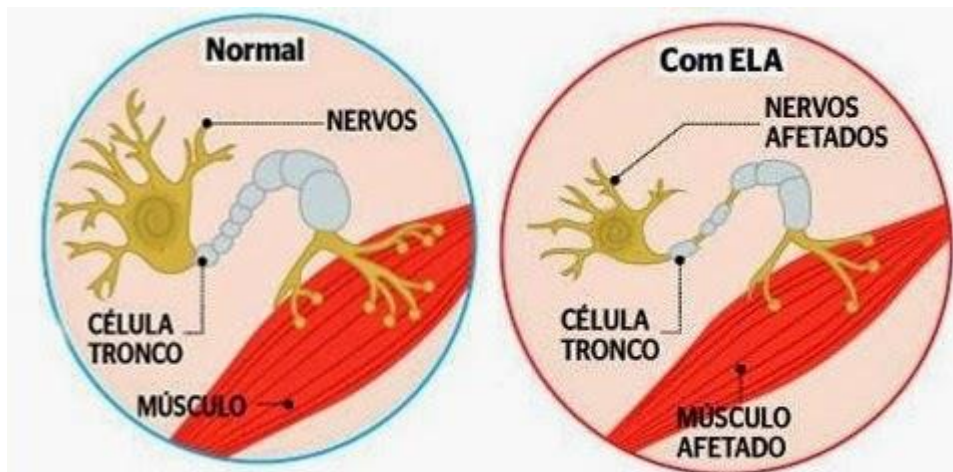
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Esclerose Lateral Amiotrófica

A esclerose lateral amiotrófica (ELA), também conhecida como Doença de Lou Gehring ou Charcot é uma doença rara e bastante complexa (LAFERRIERE e POLYMENIDOU, 2015). A ELA é uma síndrome neurodegenerativa caracterizada por perda seletiva e progressiva dos neurônios motores do córtex, tronco cerebral e corno anterior da medula espinhal (LACOMBLEZ, PIQUARD e VERCELLETTO, 2006), além da perda da mielina na medula espinhal e presença de neuroinflamação (CZAPLINSKI et al., 2006) apresentando como consequência paralisia progressiva, fasciculação, fraqueza e atrofia muscular (GELINAS, 2000).

O termo “esclerose lateral” refere-se ao endurecimento na coluna lateral da medula espinhal que ocorre devido à gliose que segue à degeneração do trato corticoespinhal (neurônio motor superior ou 1º neurônio). Por sua vez, o termo “amiotrófica” refere-se à atrofia muscular que ocorre devido à perda dos neurônios motores dos núcleos bulbares e corno anterior da medula (neurônio motor inferior ou 2º neurônio). (POLKEY *et al.*, 1999).

Figura I: Ilustração de neurônios; normal (esquerda) e com ELA (direita).



Fonte: www.abrela.org.br

A causa exata da seletiva degeneração dos neurônios motores que ocorre na ELA permanece desconhecida. A ELA acomete somente os músculos de contração voluntária, ou seja, aqueles músculos que só se movimentam quando enviamos o estímulo. Os músculos do coração e dos intestinos, por exemplo, são de contração involuntária e, portanto, são poupados.

Os sintomas da ELA ocorrem por destruição progressiva dos neurônios motores, sejam eles superiores ou inferiores. Os sintomas iniciais mais comuns são fraqueza progressiva nas mãos, dificuldade para andar, falta de força nos pés, dificuldade para falar ou engolir, câimbras ou miofasciculações. Com a progressão da doença, os sintomas que iniciaram-se de forma localizada tendem a ser espalhar por mais músculos do corpo. O paciente passa a apresentar sintomas de lesão do primeiro e do segundo neurônio motor, que podem ser identificadas através do exame físico neurológico (WIIESEKERA, L.C. e LEIGH, P., 2009).

Os pacientes também podem apresentar alterações comportamentais, labilidade emocional e depressão devido às atrofias nas regiões pré-motoras e pré-frontal e raramente alterações cognitivas. Dependendo de sua classificação, o tempo de sobrevida poderá ser de 3 a 5 anos após o diagnóstico, ocorrendo óbito por insuficiência respiratória (ANDRUS et al., 1998).

Embora a maioria dos casos de ELA seja do tipo esporádico, cerca de 10% dos casos têm uma história familiar de ELA (Esclerose Lateral Amiotrófica familiar - ELAf) (FERRANTE et al., 1997; CHEN et al., 2013). Há uma herança genética, com a maioria dos casos, de padrão autossômica dominante, embora casos de heranças autossômicas recessivas tenham sido relatados. A idade de início de ELAf é de cerca de uma década antes do que nos casos esporádicos, e afeta ambos os sexos, praticamente da mesma forma, e possuem uma menor sobrevida. Dentro dos casos de ELAf, 20% estão associados com mutações no gene superóxido dismutase 1 (SOD1) (BERGEMALM et al., 2010; KERMAN et al., 2010; CHEN et al., 2013). A mutação da SOD1 adquire propriedades que são seletivamente tóxicas aos neurônios motores, causando diversos e inesperados efeitos na estrutura, atividade e estado natural destes. Devido aos avanços em genética, foram descobertas mutações em outros genes como o TDP-43, FUS, C9ORF72 entre outros, nos casos de ELAf (BOCCITTO, LAMITINA e KALB, 2012; CHEN et al., 2013).

O caminho exato a nível molecular que pelo qual a degeneração dos neurônios motores ocorre na ELA ainda é desconhecido (FORSBERG et al., 2010), porém, acredita-se que a ELA seja uma desordem degenerativa multifatorial, na qual diversos mecanismos se interrelacionam e resultam na perda dos neurônios motores vulneráveis (GELINAS, 2000; BROCKINGTON et al., 2006). Infelizmente, ainda não existe cura para a ELA. O tratamento, portanto, visa desacelerar a progressão da doença, impedir suas complicações e melhorar a qualidade de vida.

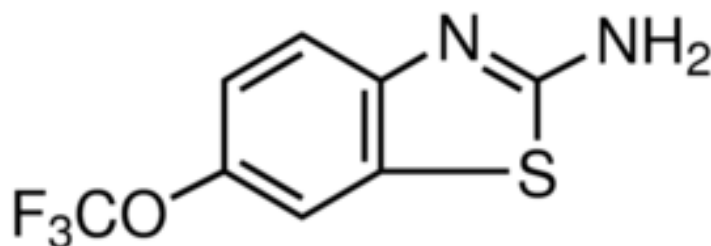
É importante mencionar que o estudo da ELAf mesmo que seja menos frequente que a ELAs, é de extrema importância e relevância. Por que as duas formas seguem cursos clínicos semelhantes e a investigação dos mecanismos relacionados à ELAf pode contribuir para elucidar os mecanismos da ELAs.

2.2. Terapias no tratamento da Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)

2.2.1. Riluzol

Atualmente, há apenas um único tratamento para ELA, o riluzol, nome comercial, Rilutek® 50mg, o 2-amino-6-(trifluorometoxi) benzotiazol é um agente neuroprotetor, com propriedades anticonvulsivantes e da classe dos benzotiazóis (ZARATE, 2008).

Figura II: Estrutura química do riluzol.



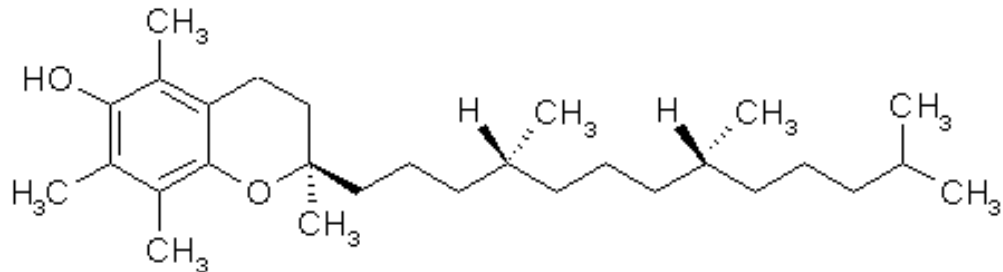
Fonte: Sigma-Aldrich®

Não se sabe completamente qual o mecanismo de ação pelo qual ele age, e sim apenas algumas hipóteses, como pelo efeito inibitório da liberação de glutamato, ou pela inativação dos canais de sódio (LACOMBLEZ et al., 1996). O riluzol foi capaz de retardar o tempo de morte em ratos transgênicos como modelo de ELA (CHEAH et al., 2010). Esses ratos expressavam o gene da *sod1* com uma das mutações encontradas em pacientes com a ELA. Já em testes *in vitro*, o Rilutek protegeu os neurônios motores de ratos dos efeitos excitotóxicos do ácido glutâmico e preveniu a morte de neurônios corticais (PAILLISSE et al., 2005). O medicamento é bem tolerado pelos pacientes com ELA embora apresente alguns efeitos adversos como dores de cabeça, náuseas, astenia, sonolência, dor abdominal, hipertensão. O efeito mais alarmante é o aumento das enzimas hepáticas. Autorizado pela US FDA, os pacientes apresentam taxa de sobrevivência com o uso do medicamento de meses, sendo necessária a procura por outros agentes terapêuticos que sejam mais efetivos contra essa doença.

2.2.2. α -tocoferol (vitamina E)

O alfa-tocoferol é um poderoso antioxidante lipossolúvel sendo a isoforma mais importante da vitamina E (WANG et al., 2012; NIKI, 2014). Estudos relatam que a vitamina E possui um poder neuroprotetor contra agentes que induzem neurotoxicidade como manganês, peróxido de hidrogênio, glutamato (TOME, FENG e FREITAS, 2010; MILATOVIC et al., 2011). Também apresentando proteção contra anticonvulsivantes (RIBEIRO et al., 2005). Além disso, a vitamina E mostrou proteger contra danos cognitivos e da memória, induzidos por agentes tóxicos (GUERRERO et al., 1999), além de proteger gestante e feto durante a gravidez (WANGKHEIMAYUM, KUMAR e SURI, 2011).

Figura III: Estrutura química do alfa-tocoferol.



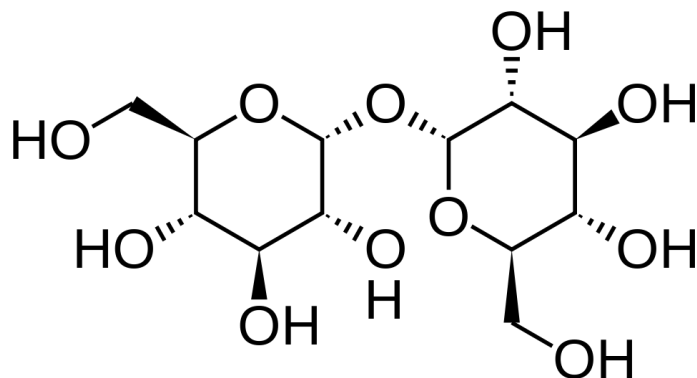
Fonte: Sigma-Aldrich®

Em outros modelos de estudo, como em *C.elegans*, a ingestão normal de vitamina E não afeta a termossensibilidade nem a quimiotaxia dos vermes (LI et al., 2013), além de aumentar a longevidade do vermes (ERNST et al., 2013). Em ratos, a vitamina E causou um atraso no início dos sintomas da ELA (WANG et al., 2011), porém não apresentou bons resultados quando testada em testes duplo-cego em humanos com a doença (DESNUELLE et al., 2001; GRAF et al., 2005). Em modelo transgênico da ELA em ratos, uma dieta com suplementação de vitamina E atrasou o início dos sintomas e a progressão, porém não prolongou a vida dos animais (GURNEY et al., 1996).

2.2.3. Trealose

É um dissacarídeo não-redutor, formado por duas moléculas de glicose, ligadas entres si por uma ligação glicosídica 1-1 alfa, que ganha o nome de α -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 1)- α -D-glicopiranosida.

Figura IV: Estrutura química de trealose



Fonte: Sigma-Aldrich®

É uma molécula estável, que não é facilmente hidrolisada e não reage com grupos amino em reações de glicação não-enzimáticas (CHEN Q. e HADDAD GG.2004), também foi reportada por apresentar propriedades interessantes de serem estudadas, como abrandar as doenças relacionadas ao acúmulo da poliglutamina (polyQ), como o Huntington, provavelmente por prevenção da agregação anormal da proteína (TANAKA et al., 2004; KIKAWADA et al., 2007).

Auxilia também na inibição da apoptose celular (SEKI et al., 2010). Em ratos mutantes, a trealose retardou a progressão da ELA pelo aumento da autofagia em motoneurônios (CASTILLO et al., 2013). Em, *C. elegans*, a trealose aumentou a longevidade dos nematoides em função da redução da desnaturação proteica (HONDA, TANAKA e HONDA, 2010).

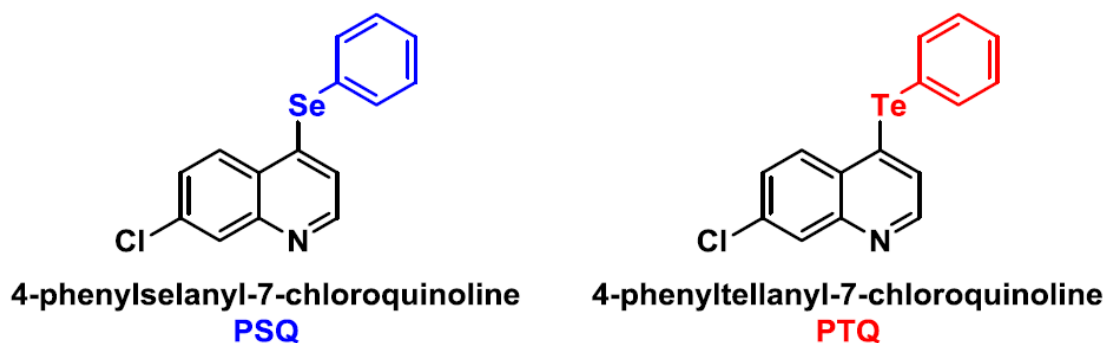
2.2.4. Compostos de selênio (Se) e telúrio (Te)

O Selênio (Se) é um microelemento essencial para a alimentação humana e animal (COMBS Jr e COMBS, 1984). É importante para a síntese de

selenoproteínas, onde é incorporado como selenocisteína. De particular importância, GPx e TrxR são dois dos selenoenzimas mais importantes envolvidos na defesa celular contra estresse oxidativo (HOLBEN e SMITH, 1999) . Assim, considerando que as suas formas inorgânicas são mal absorvidas e apresentam muitos efeitos tóxicos em altas concentrações, o interesse em formas orgânicas de selênio que sejam menos tóxicas e melhor absorvidas vem aumentando (PUNTEL et al, 2016).

Por sua vez, o Telúrio (Te) está bioquimicamente relacionado a bactérias e fungos, as propriedades biológicas de Te em células de mamíferos ainda não são relatados. Compostos de organotelúrio também são conhecidos por possuírem maior atividade semelhante à GPx, em comparação com os análogos de selênio [13]. Ao mesmo tempo, compostos de organotellúrio são antioxidantes eficazes, uma vez que foram encontrados por serem capazes de reduzir o peroxinitrito (ONOO⁻), limpar os radicais livres e proteger contra danos das EROs causado pela metalotionina. Deste modo, o efeito farmacológico e/ou toxicológico de compostos de organotellúrio poderia ser resultante da oxidação e subsequente inibição de proteínas e enzimas contendo cisteína. (PUNTEL, 2016).

Figura V: Estrutura química dos organocompostos de selênio e telúrio, respectivamente.



Fonte: Pinz et al, 2016

Organocalcogênios, especialmente organoselênio e compostos organotelúrio são agentes farmacológicos promissores conhecidos por possuir uma ampla gama de efeitos biológicos (NOGUEIRA E ROCHA, 2011). Considerando que a sua toxicidade é principalmente associada à inibição de tiol e/ou selenol contendo enzimas (NOGUEIRA, et al, 2004). Deve se notar a quantidade de organocalcogênios sintetizados recentemente (centrados em Se ou Te) com potencial farmacológico, o que torna a investigação sobre a toxicidade/farmacologia desses compostos ainda mais necessária (PUNTEL et al, 2016).

Estudos anteriores (AVILA et al, 2012 e WOLLENHAUPT et al., 2014) mostram que compostos de organoselênio e organotelúrio atenuam a toxicidade induzida por manganês em *C.elegans* prevenindo o estresse oxidativo, demonstrado através da translocação nuclear de DAF-16. Resultados encontrados por SALGUEIRO et al, 2014, mostraram que cloro-quinolinas reduziram a formação de ERO induzida por paraquat no corpo do verme, provavelmente por uma resposta hormética que regula a expressão de enzimas como SOD-3 e CTL-1,2,3, modulando a translocação nuclear de DAF-16, ilustrando a utilidade do modelo para identificação de alvos farmacológicos no desenvolvimento de novos medicamentos.

2.3. *Caenorhabditis elegans* como modelo para o estudo da ELA

Caenorhabditis elegans (*Caeno*-recente; *rhabditis*-redondo; *elegans*-elegante) (*C. elegans*) é um nematóide de vida livre da família *Rhabditidae* que mede cerca de 1 milímetro de comprimento e vive normalmente no solo. Nas últimas décadas, descobertas importantes com relevância para os mamíferos foram realizadas usando este nematoide (BRENNER,1974).

O *C. elegans* apresenta uma forte conservação com os mamíferos em princípios celulares e moleculares, com homologia gênica de 60%-80% (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), (BRENNER, 1974; KALETTA e

HENGARTNER, 2006). Atualmente, este organismo modelo é cada vez mais usado nos estudos de substâncias benéficas e tóxicas aos processos biológicos, bem como para identificar novos alvos para intervenções farmacológicas (CULETTO e SATTELLE, 2000; GAMI e WOLKOW, 2006; KALETTA e HENGARTNER, 2006). Em contraste com os estudos com células livres e cultura de células, o *C. elegans* permite a investigação dentro do contexto de um organismo completo, com células bem diferenciadas (BRENNER, 1974).

Além disso, o *C. elegans* é de fácil cultivo tanto em meio sólido quanto em líquido e sua pequena dimensão permite a realização de diversos ensaios. Por ser um verme transparente, marcadores fluorescentes, por exemplo, genes repórteres, podem ser observados nos animais vivos. Além disso, proteínas como o transportador de dopamina podem ser marcadas com a proteína verde fluorescente (do inglês GFP), proporcionando a visualização dos neurônios dopaminérgicos no microscópio de fluorescência *in vivo* (CHALFIE et al., 1994).

Entre os genes repórteres podemos citar o DAF-16, que é um fator de transcrição homólogo ao fator de transcrição pertencente à família das proteínas FOXO. O DAF-16 funciona como um fator de transcrição que atua na via da sinalização insulina/IGF-1 controla vários processos biológicos tais como longevidade, reserva lipídica, reprodução, resposta ao estresse, termotolerância, resistência a patógenos, metabolismo e autofagia (LEE et al., 2003), regulando a formação da larva dauer (estágio de atividade metabólica baixa durante a restrição calórica).

Outra vantagem é que o *C. elegans* possui um ciclo reprodutivo curto – dois a quatro dias – e o tempo de vida dos animais tipo selvagem (N2) é de aproximadamente quatro semanas, o que o torna um bom modelo para estudos de longevidade (BRENNER, 1974).

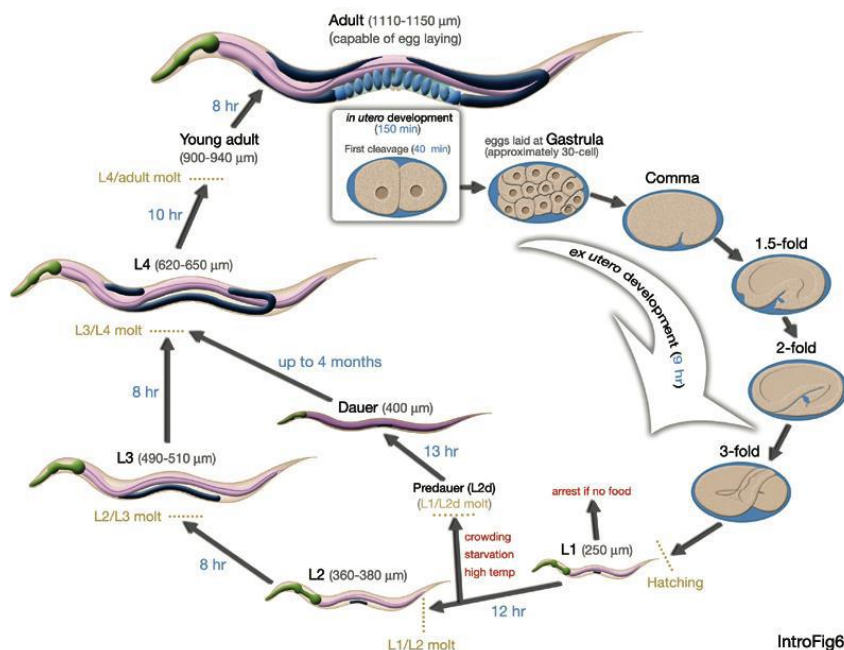
Na natureza, o *C. elegans* é encontrado predominantemente como hermafroditas (>99%) que se autofecundam e a população pode ser mantida efetivamente isogênica já que um hermafrodita individual produz uma progênie de aproximadamente 300 clones durante a primeira semana de vida adulta. Tal utilização, de modelo animal alternativo respeita a política dos 3Rs (reciclar, reutilizar e reduzir), a qual tem sido amplamente visada pela comunidade científica.

Com 302 neurônios bem caracterizados (HOBERT, 2005), o *C. elegans* proporciona um modelo *in vivo* para estudos de mecanismos de danos neuronais. Portanto defeitos na locomoção refletem problemas na rede neuronal.

Estudos prévios demonstram que a exposição aguda ao manganês causa degeneração específica de neurônios dopaminérgicos, efeito que pode ser constatado utilizando esse modelo (BENEDETTO et al., 2010).

Para investigar se a perda da função de SOD1 contribui nos primeiros estágios e no avanço da doença, foram criadas em laboratórios cepas transgênicas de *C. elegans* com alelos conservados de pacientes H71Y e G85R. Na ELAf, esses alelos de *sod-1* aumentaram a agregação de SOD-1 em neurônios motores (HART, et al, 2016).

Figura VI: Ciclo de vida do *C. elegans*.



Fonte: Wormatlas

3. JUSTIFICATIVA

A com o aumento da expectativa de vida a população mundial está cada vez mais sujeita ao risco do desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, que, por sua vez são altamente incapacitantes. A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é uma doença neurodegenerativa rara e incurável, sendo necessários estudos a respeito de novos agentes terapêuticos para que se possa retardar a progressão da doença e que os pacientes tenham uma sobrevida com maior qualidade. Para estes estudos iniciais, é importante que se faça um *screening* tóxico-farmacológico em modelos alternativos ao uso de mamíferos, em especial modelos *in vivo* que permitam a observação do sistema nervoso afetado pela esclerose lateral amiotrófica.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a eficácia de diferentes compostos na análise da paralisia e efeitos deletérios causados nas mutações da Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA) em modelo *Caenorhabditis elegans*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar parâmetros de ELA em *C.elegans* com mutações específicas para desenvolvimento da doença;
- Determinar se o tratamento com compostos como a trealose, vitamina E, os compostos de selênio e telúrio reduzem a letalidade e a paralisia;
- Avaliar se os compostos reduzem a produção de espécies reativas de oxigênio;

PARTE DOIS

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. O manuscrito está apresentado da mesma forma que será submetido à Revista Neuroscience Research.

**Screening of different compounds against paralysis and deleterious effects in
Amyotrophic Lateral Sclerosis model in *Caenorhabditis elegans***

Dal Forno, A.H. ^a, Moraes, L. ^a, Tambara, A. ^a, Salgueiro, W. ^a, Motta, H. ^a, Denardin,
C. ^a, Avila, D. ^{a*}

^a Universidade Federal do Pampa, Uruguaiiana, Brazil

*Corresponding author:

Daiana Silva Ávila
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
BR 472 – Km 592 – Caixa Postal 118
CEP 97500-970 Uruguaiiana /RS
Email: avilads1@gmail.com

Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a fatal paralytic disorder characterized by degeneration of motorneuron which is generally fatal within five years of diagnosis and with no current effective treatment. Approximately 10% of the ALS cases are familial ALS (fALS) and about 20% of fALS are associated with mutations in the superoxide dismutase 1 gene (SOD1). Seeking for alter native experimental models that may substitute and offer new possibilities to assay xenobiotics toxicity, the nematode *Caenorhabditis elegans* has been found favorable as a valuable bioindicator organism. Using *C. elegans* transgenic strains as ALS model HA2619, HA2622, HA2425, HA2426 we tested compounds to evaluate the efficacy in treatment of ALS. Trehalose (5mM) with vitamin E (200µg/mL) and the organocompounds (1µM) 4-phenylselanyl-7-chloroquinoline (PSQ) and 4-phenyltellanyl-7-chloroquinoline (PTQ) were tested. None of the treatments tested positive for increased longevity or delayed or decreased paralysis, which led us to wonder if the treatments may have triggered an increase in symptoms and worsening of the worms. We also observed the treatment with the organocompounds against the oxidative damage caused by hydrogen peroxide (0.6µM) was not reversed. Further studies are needed to find therapies that may prolong longevity and decrease or delay paralysis.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis, trehalose, vitamin E, organocompounds, *Caenorhabditis elegans*

1. Introduction

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) also called Lou Gehrig's disease, is the most common motorneuron disease in adults (Castillo et al, 2015), characterized by rapidly progressive degeneration of both upper and lower motor neurons, paralysis, atrophy and respiratory failure leading to death typically within 1 to 5 years after onset and diagnosis (Lafferriere and Polymenidou, 2015). The pathological hallmark of ALS is the presence of inclusion bodies containing aggregated proteins in motor neurons and glial cells primarily in the spinal cord (Kerman et al, 2010). While ~90% cases of ALS occurs sporadically (sALS) there are ~10% of cases called familial ALS (fALS) there is clear indication of genetic inheritance. And about ~20% of fALS are associated with mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase 1 gene (SOD1) (Chen et al, 2013). There is no cure for ALS and the only effective treatment is riluzole, a glutamate release inhibitor, which was shown to slow the rate of progression and to prolong survival time in three months. Therefore, it is demanding to investigate other therapeutics alternatives agents and test their toxicity. One of the targets is the oxidative stress found in the patients.

The role for oxidative stress in the pathogenesis of ALS is supported by the presence of biomarkers of oxidative damage in sALS patients. Radical scavenging antioxidant is one of the essential roles of antioxidants and vitamin E is the most abundant and important lipophilic radical-scavenging antioxidant *in vivo*. The isoform α -tocopherol has the highest biological activity (Nikki, 2014) and has been shown to delay the onset of clinical disease in transgenic mice expressing ALS (Wang et al, 2011).

Trehalose is a natural disaccharide formed by two glucose molecules with chemical chaperone activity. It is suggested to act as a stress protectant against heat, cold, desiccation, anoxia, and oxidation (Honda et al, 2010). Trehalose treatment induces the degradation of diverse aggregate-prone proteins through autophagy in cell culture models and trehalose has important neuroprotective effects in animal models of Parkinson, Alzheimer and Huntington disease (Castillo et al, 2015).

Organoselenium and organotellurium compounds have been described by their anti-inflammatory, anticancer and neuroprotective properties (Avila et al, 2012). Previous studies have shown that organocompounds attenuated Mn-induced toxicity and prevented oxidative stress in *C. elegans* (Avila et al, 2012). In addition,

it has been described that thiochloroquinolines were able to reduce paraquat-induced ROS formation in *C. elegans* model (Salgueiro et al, 2014). Particularly, 4-Phenylselenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has antinociceptive and anti-inflammatory actions in rats (Pinz et al, 2016).

In order to perform a wide screening of possible therapies, we used a simpler *in vivo* model, the nematode *Caenorhabditis elegans*. *C. elegans* is an useful experimental model given the high orthology between the worm and the human genomes, its ease of handling and the relatively straightforward generation of knockout strains for genes of interest as well as transgenic worms. Furthermore, researchers can precisely identify specific neurons and follow their development or survival throughout the animal's lifetime (Voisine and Hart, 2004). To investigate whether SOD1 loss of function contributes to disease and early-stage events, we used worms that were inserted with conserved patient alleles H71Y and G85R into the *C. elegans sod-1* gene. fALS *sod-1* alleles increased aggregation of human wild-type SOD1-YFP in motor neurons (O'Hern, Simon and Hart, 2015).

Notably, their large brood size and short life and reproductive cycles allows low- and high-throughput screens for toxicants have been established (Helmcke et al, 2010).

Hence, the aim of this study was to evaluate different compounds as therapeutic alternative for the treatment of ALS using a *C. elegans* model carrying a human mutation in the SOD1 gene.

2. Material and Methods

2.1 Reagents: DL-alpha tocopherol acetate obtained from SUPELCO® and trehalose obtained from Sigma-Aldrich®. 4-Phenylselenyl-7-chloroquinoline (PSQ) and 4-phenyltellanyl-7-chloroquinoline (PTQ) were synthesized and characterized as previously described (Tetrahedron Letters, 2013).

2.2 *Caenorhabditis elegans* strains and handling: *C. elegans* were cultured under standard conditions at 20°C and fed the *E.coli* OP50 (Stiernagle, 2006). To model ALS we used transgenic strains that were generously donated from the Anne Hart lab (Brown University, USA). The strains were HA2619 (*tm766*)II; rt Si 001 [*sod-1*(+)]IV, HA2622 (*tm766*)II; Si 026 [empty]IV, HA2425 (*tm766*)II; rt Si 007 [*sod-1*(H71Y)]IV,

HA2426 (*tm766*)II; rt Si 006 [*sod-1*(G85R)]IV. These mutants are equivalent to the human SOD1 G85R mutation with low SOD1 activity. The others strains AM 263 (*mls 175*), BC10929 (*dpy-5* (*e907*))I sEx *fust-1*, GA187 (*sod-1* (*tm776*))II, RB929 (*tdp-1* (*ok803*))II, RB2260 (*alfa-1* (*ok3062*))II were obtained from Caenorhabditis Genetics Center (CGC).

2.3 Treatments: Worms were synchronized by preparing the eggs from gravid adults by bleaching solution (1%NaOCl:0,25M NaOH). The synchronized eggs were allowed to develop on M9 medium plates. For the treatment, L1 larvae staged worms were transferred to NGM plates containing trehalose (5mM) and vitamin E (200µg/mL).

For the treatment with the Se and Te compounds, worms were synchronized and then L1 worms were exposed to 1µM doses of Se- and Te- compounds for 30 minutes. Subsequently, worms were washed three times in 85mM NaCl to remove the compounds.

2.4 Survival assay to detect acute toxicity: 24 hours following treatments, live worms were counted by using a grid with 20 labeled squares, to avoid bias from the observer. Data was normalized to percentage of control (untreated worms). Each experiment was performed three times.

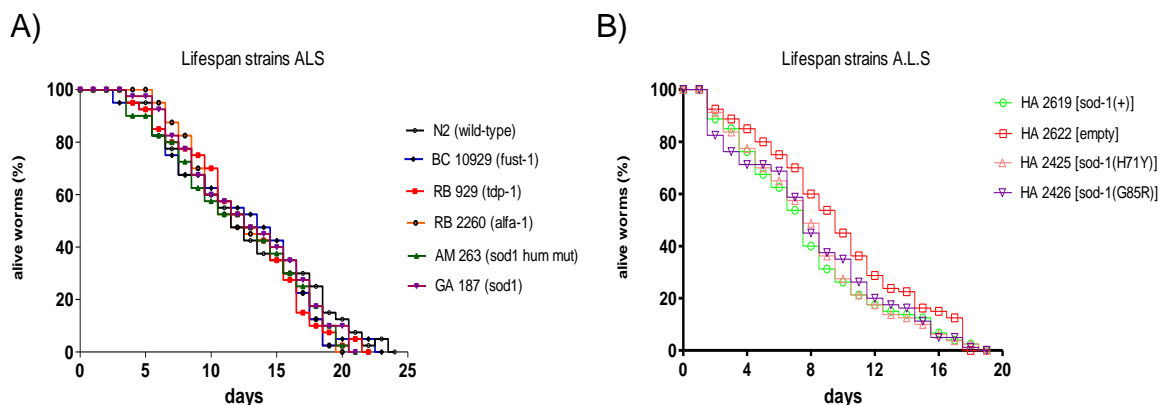
2.5 Lifespan assay: L4 stage worms were transferred to new plates containing NGM with trehalose and vitamin E, with *E. coli* OP50 UV killed as food source. Worms were maintained and counted each day and transferred to new NGM plates with trehalose and vitamin E until all the worms died. To assay lifespan of worms treated with the compounds, which were exposed only for 30 minutes, they were aged until they reach L4 stage and then counted each day and transferred every 2 days to new *E. coli* OP50-seeded NGM plates. Survival was assessed each day until all the worms died. Experiments were performed with 20 worms per plate in duplicate. Each experiment was performed at least three times.

2.6 Paralysis analysis: Worms were observed daily and scored as paralyzed if they moved their noses and pharynx but failed to move their bodies when tapped with a worm picker. Experiments were performed with 20 worms per plate in duplicate. Data was normalized based on the number of worms alive on the plate. Each experiment was performed at least three times.

2.7 Statistical Analysis: All values are presented as mean \pm SEM. The statistical significance of differences ($p < 0.05$) was evaluated by non-parametric ANOVA with Tukey post hoc test using GraphPad Prism software.

3. Results and Discussion

3.1. Evaluation of Amyotrophic Lateral Sclerosis model in worms: First, we verified longevity and paralysis of the strains to observe how the different strains would behave. Although several genetics mutations are known to be associated with ALS, the most studied gene in ALS models (mostly because it is prevalent in fALS) is the gene linked to *sod-1*. He have received transgenic strains that were specific for this model, which were chosen for this study. In figure 1A, longevity was performed in several strains with different ALS-linked genes, and no significant difference was found. In Figure 1B, longevity with the mutant *sod-1* strains was evaluated and again no significant difference was found between them. It is known that one of the major hallmarks of ALS is the low rate of survival after diagnosis as well as paralysis, which was analyzed in worms and demonstrated in Figure 1C. No significant difference was found, all of them began to show paralysis from the tenth day of life.



C)

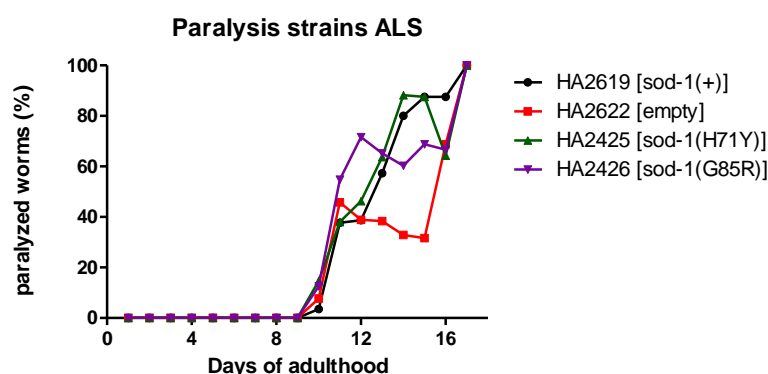


Fig 1: Analysis of the transgenic strains *per se*. Analysis of lifespan (1A and 1B) did not show different significance in lifespan. The mean of survival were not significantly different ($p < 0,05$). Analysis of paralysis (1C). Data are expressed as mean of three different experiments.

3.2.: ALS treatment with trehalose (5 mM) + vitamin E (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$): The treatment of ALS-like model worms was attempted with trehalose + vitamin E placed on the top of NGM plates with *E. coli* OP50 bacterium killed by UV radiation. Survival analysis was performed after 24 hours of exposure and showed no significant difference, showing that the compounds are not toxic at these concentrations (Fig 2A). Longevity (Fig 2B) of the different strains treated with trehalose + vitamin E were not different from ALS strains, thus indicating that the treatment was not effective but a difference was found between the untreated strains HA2619 and HA2426 ($\#p < 0.05$) and among the strains HA2622 and HA2426 ($*p < 0.05$). Furthermore, in paralysis assay (Fig 2C) the graphic shows that strain HA2425 treated with trehalose and vitamin E paralyzed more than the others and the strain HA2622 untreated has less paralysis. The paralysis is a hallmark of ALS and we hypothesized that we would obtain positive results with trehalose and vitamin E association treatment.

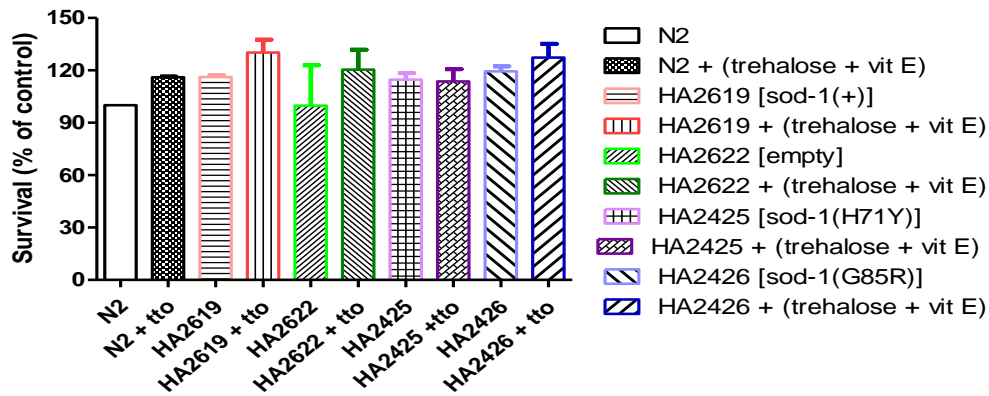
Results obtained from rats and cells studies with trehalose administration had shown benefic effects such delaying in ALS the progression by enhancing autophagy in motorneurons (Castillo et al, 2013) and also longevity extension in the nematode *C.elegans*. These results suggest that trehalose suppressed aging by counteracting internal or external stresses that disrupt protein homeostasis. On the other hand, the lifespan-extending effect of trehalose was abolished in long-lived insulin/IGF-1-like receptor (*daf-2*) mutants (Honda et al, 2010). Trehalose may provide primary prevention of neurodegenerative disease (Emanuele, 2014) by inhibiting the misfolding of native proteins in the brain, promoting their refolding, and modifying

early events in the aggregation process. Castillo et al. have recently reported that administration of trehalose to mutant *sod1* transgenic mice (a mouse model of ALS) resulted in an improved survival and a significant attenuation of disease signs. These effects were associated with a reduced accumulation of SOD1 aggregates, which ultimately led to an improved motoneuron survival. Cell culture experiments demonstrated that the protective effects of trehalose were associated with increased autophagy levels in primary motoneurons, as demonstrated by a significant upregulation in the expression of key autophagy-related genes. Interestingly, an in vitro study by Wang et al also demonstrated that trehalose is able to decrease cellular levels of TDP-43 by acting as a potent enhancer of autophagy. Consistently, Zhang et al. have recently reported that trehalose decreases SOD1 aggregation, reduces ubiquitinated protein accumulation, and improves autophagic flux in the motor neurons of the SOD1G93A mouse model of ALS.

In addition, vitamin E administration in rats caused protection against pentylentetrazol and methylmalonate-induced convulsions (Ribeiro et al, 2005). In addition, vitamin E showed a protective effect against PCB-induced toxicity and downregulation of the extracellular dopamine level in rats and cells (Yunet al, 2005). In the nematode *C. elegans*, trace administration of vitamin E can retrieve and prevent UV irradiation and metal exposure (Ye, H.Y, 2008). Extensions of lifespan following more than 200µg/mL of vitamin E administration have been reported in the nematodes *Caenorhabditis briggsae* (Epstein and Gershon, 1972). In *C. elegans* was due to its ability to scavenge free radicals and stabilize biomembranes (Goldstein and Modric, 1994).

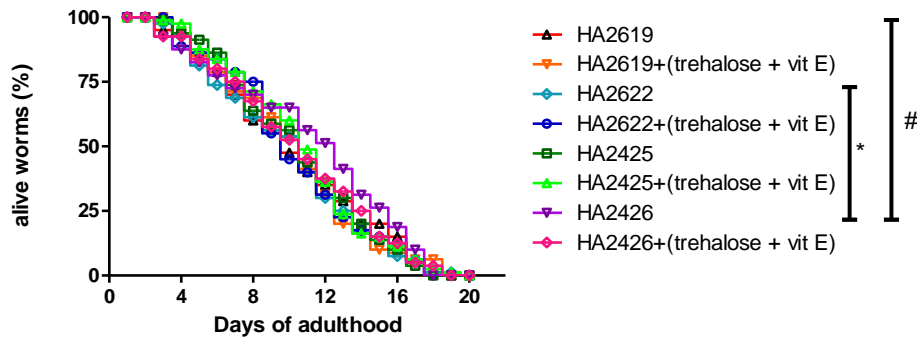
However, these benefic results were obtained when these molecules were tested separately. Perhaps because they have not been tested together, they may not have additive effects or can be annullating themselves.

A) Survival ALS Trehalose 5mM + Vitamin E 200µg/mL



B)

Lifespan ALS Trehalose 5mM + vit E 200µg/mL



C)

Paralysis ALS Trehalose 5mM + vitamin E 200µg/mL

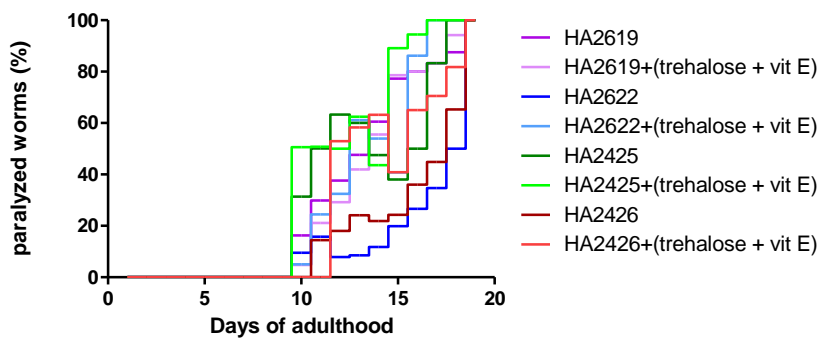


Fig.2: Analysis of treatment with trehalose and vitamin E. Survival assay (2A) of treatment with trehalose 5mM + vitamin E 200µM/mL. The transgenic strains did not shown significant difference between the controls and treated worms. Lifespan (2B) of worms treated with trehalose 5mM and vitamin E 200µg/mL per plate shown significant difference between the strains HA2619 and HA2426 (#p<0.05) and between HA2622 and HA2426 (*p<0.05). Paralysis assay (2C) of worms treated with trehalose 5mM and vitamin E 200µg/mL did not shown significant difference between the strains. Data are expressed as mean of three different experiments.

3.3. Organoselenium and organotellurium compounds effects on ALS strains:

Selenium and tellurium quinolines were tested for potential neuroprotection. Worms were treated with PTQ or PSQ compounds (1 μ m) for 30min followed by saline washes for three times and then placed on the NGM / OP50 plates. Survival rate (Figure 3) demonstrated that the compounds did not caused toxic effects but instead increased worms survival in a significant manner (*p <0.05). As shown in Figure 3A, there is a significant difference among the controls (DMSO and N2+Se) and the strains HA2619, HA2425 and HA2526 (*p<0.05). In addition, a significant difference between the strains HA2619, HA2622 and HA2425 (#p<0.05), thus indicating that the acute treatment with PSQ 1 μ M was not toxic but beneficial, considering survival rate. We have observed similar effects when PTQ 1 μ M was administered (Figure 3B). A significant difference among the controls DMSO and N2+Te and the strains HA2622, HA2425 and HA2426 (*p<0.05) was observed, as well as among strains HA2622, HA2425 and HA2426 (#p<0.05), indicating the acute treatment PTQ 1 μ M increased survival rate.

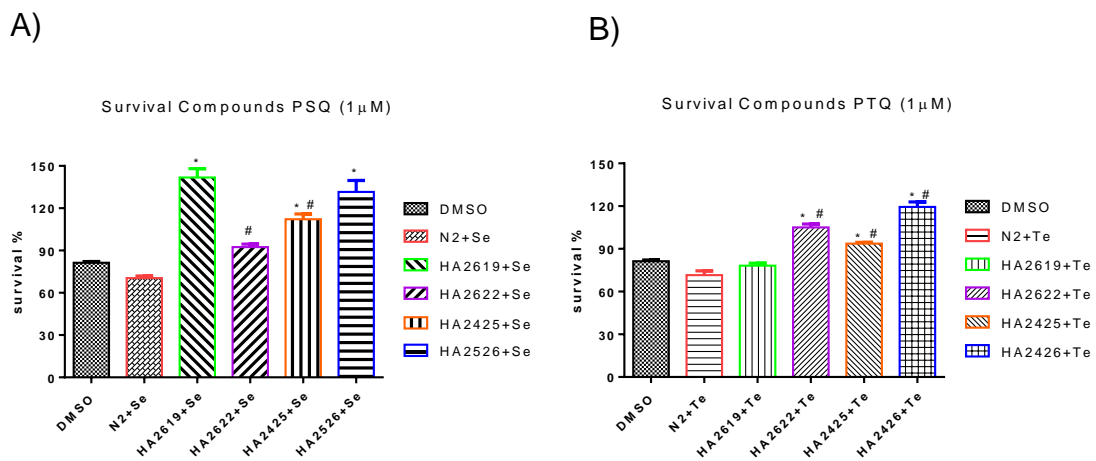


Fig.3: Survival assay with organocompounds. Se (PSQ) [3A] compounds shown significant difference between the controls DMSO and N2+Se and strains treated HA2219, HA2425 and HA2426 (*p<0.05). And significant difference between strains HA2622 HA2425 against HA2619. In [3B] Te (PTQ) compounds shown significant difference between the controls DMSO and N2+Te and strains treated HA2622, HA2425 and HA2426 (*p<0.05). A significant difference was found between strains HA2622, HA2425 and HA2526 (#p<0.05). Data are expressed as mean of three different experiments.

In order to determine whether selenium and/or tellurium compounds would protect the strains against oxidative damage, worms were exposed to hydrogen peroxide (0.6 mM) for 30min following compounds treatment (protection protocol). Survival rate against H₂O₂ demonstrated in Figure 4. Results show its lethality to the worms and that the treatment with PSQ (4A) has a trend to improve the H₂O₂ damage in strains HA2619 and HA2425 (*p<0.05). The treatment with PTQ (4B) partially protected HA2619 and HA2425 worms from the oxidative damage caused by hydrogen peroxide. Previous studies have indicated that mice and rats show distinct responses to organochalcogens, with rats appearing to be more sensitive to organotellurium compounds.

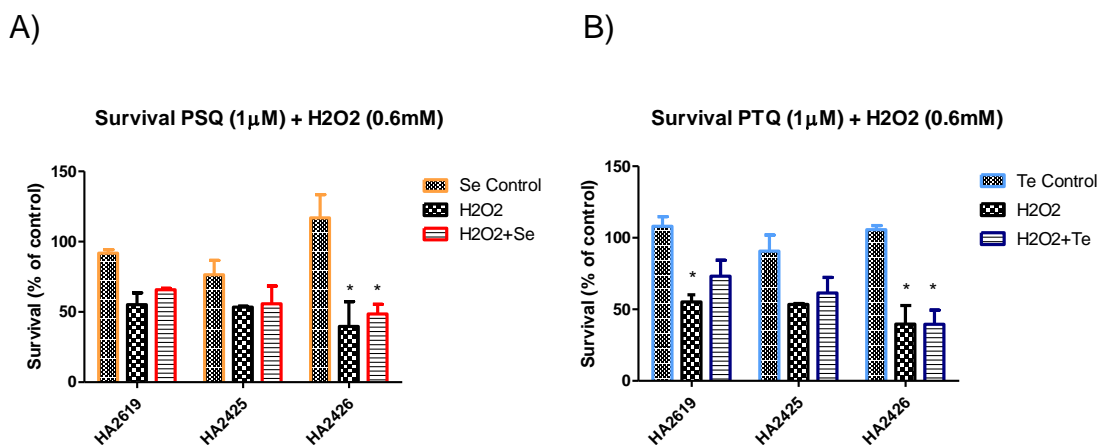


Fig. 4: Survival assay with organocompounds and hydrogen peroxide. Organoselenium (4A) PSQ compounds shown significant difference in HA2426 between the control and treated with H₂O₂ (*p<0.05) and organotellurium compounds (4B) PTQ shown significant difference in HA2619 control and treated with hydrogen peroxide (H₂O₂) and in HA2426 (*p<0.05). Data are expressed as mean of three different experiments.

Organochalcogens, especially organoselenium and organotellurium compounds, are promising pharmacological agents known to possess a wide range of biological effects (Nogueira and Rocha, 2011)]. Accordingly, these compounds are thought to exert their pharmacological effects by mimicking native Glutathione Peroxidase enzyme (GPx-like activity) or by being a substrate of Thioredoxin Reductase (TrxR) (Nogueira and Rocha, 2011); whereas their toxicity is primarily associated with inhibition of thiol- and/or selenol-containing enzymes (Nogueira, Zeni and Rocha, 2004). Of note, the quantity of newly synthesized organochalcogens

(centered on Se or Te) with pharmacological potential is increasing rapidly, which makes the research about the toxicity/pharmacology of the organochalcogens even more exciting. Selenium (Se) is an essential microelement for human and animal nutrition (Combs Jr and Combs, 1984). It is important for selenoprotein synthesis, where it is incorporated as selenocysteine (Holben and Smith, 1999). Of particular importance, GPx and TrxR are two of the most important selenoenzymes involved in cell defense against oxidative stress. Thus, considering that inorganic forms of Se are poorly absorbed and present many toxic effects at high concentrations, the interest in organic forms of selenium that are less toxic and better absorbed has increased. In turn, despite the fact that tellurium (Te) is chemically related to Se and can be occasionally found in some proteins from bacteria and fungi, the biological properties of Te in mammalian cells are not yet reported. Organotellurium compounds are also known to possess greater GPx-like activity as compared to the selenium analogues (Puntel et al, 2016). At the same time, organotellurium compounds are effective antioxidants, once they were found to be able to reduce peroxynitrite (ONOO^{*}), scavenge free radicals and to protect against ROS-mediated metallothionein protein damage. Hence, either pharmacological and/or toxicological effect of organotellurium compounds could be resultant from oxidation and subsequent inhibition of cysteine-containing proteins and enzymes. Selenoxylofuranosides have also been shown to attenuate Mn-induced toxicity, by regulating the DAF-16/FOXO signaling pathway, and ebselen was shown to be effective in reversing Mn-induced reduction in survival and lifespan in *C. elegans* (Avila et al, 2012 and Wollenhaupt et al, 2014).

Figure 5 shows the analysis of worms lifespan treated with selenium compound – PSQ (5A) and organotellurium compounds – PTQ (5B). After 48 hours of treatment, worms were replaced to new NGM/seeded and counted daily. There was a significant difference between untreated worms HA2619 and HA2426 (#p<0.05). And there was a significant difference in the strains HA2426 and HA2426+Se in worms treated (*p<0.05). The result was nonetheless negative, indicating that the compound was not benefic in this model. The results with PTQ 1µM shown a significant difference between the control strains HA2619 and HA2425 (#p<0.05) and between HA2619+Te and HA2426+Te (@p<0.05). We have observed a significant difference between treated and untreated worms HA2426 (*p<0.05).

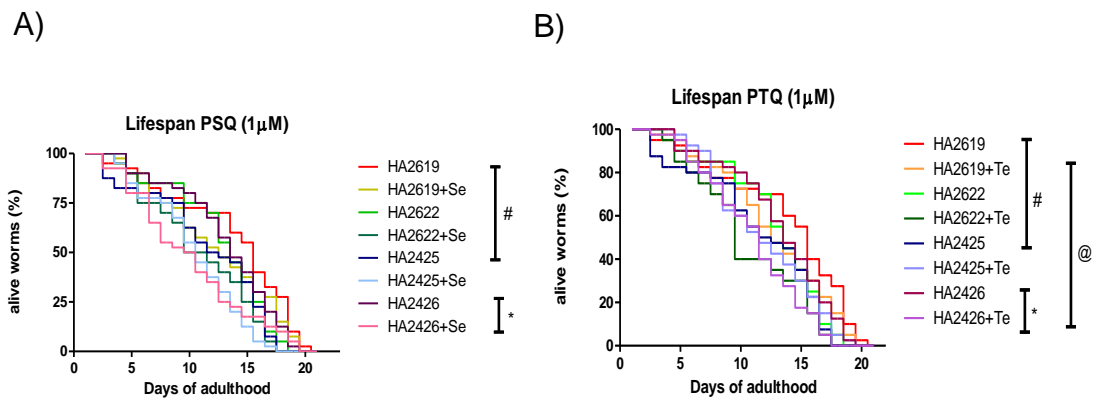


Fig. 5: Lifespan of worms treated with organocompounds. (5A) organoselenium (PSQ) shown significant difference between the untreated strains HA2619 and HA2425 (# $p < 0.05$) and between the strain HA2426 treated and untreated worms. With (5B) organotellurium (PTQ) compounds shown significant difference between the untreated strains HA2619 and HA2425 (# $p < 0.05$) and between the treated strains HA2619+Te and HA2426 (@ $p < 0.05$) and untreated worm strains HA2426 (* $p < 0.05$). Data are expressed as mean of three different experiments.

The paralysis analysis were performed from the first day and at the tenth day the worms began to show signs of paralysis. The results (Figure 6A) shown significant difference (* $p < 0.05$) between the untreated strains HA2622 [empty] and the transgenic HA2425 [H71Y], showing that the model is reliable. With PTQ treatment (Figure 6B), we observed a significant difference in strain HA2426 (treated vs untreated - * $p < 0.05$). Unfortunately treated worms paralyzed more than untreated worms. The treatment with PSQ and PTQ did not improve the paralysis of the worms.

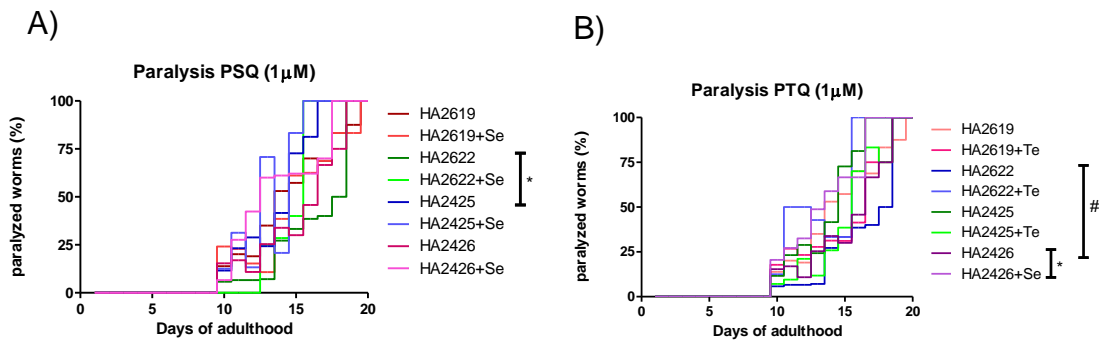


Fig 6: Paralysis assay of the transgenic strains treated with (6A) organoselenium (PSQ) shown significant difference between the untreated strains HA2622 and HA2425 (* $p < 0.05$) and (6B) organotellurium (PTQ) compounds shown significant difference between the untreated strains HA2622 and HA2426 (# $p < 0.05$) and between the HA2426 treated and untreated worms (* $p < 0.05$). Data are expressed as mean of three different experiments.

4. Conclusion

Our studies shown the trehalose associated with vitamin E did not decrease the paralysis or extended the lifespan of ALS mutant worms. Furthermore, treatment with organocompounds also did not extend lifespan or decreased paralysis in *C. elegans* caused by the progression of amyotrophic lateral sclerosis. Further studies are needed to find therapies that may prolong longevity and decrease or delay paralysis, and *C. elegans* is a great asset for this purpose.

References

ÁVILA, D.S.; BENEDETTO, A.; AU, C.; MANARIN, F.; ERIKSON, K.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.T.; ASCHNER, M. Oganotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* by preventing oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 9, p. 1903-1910, 2012

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

CASTILLO, K.; NASSIF, M.; VALENZUELA, V.; ROJAS, F.; MATUS, S.; MERCADO, G.; COURT, F.A.; van ZUNDERT, B.; HETZ, C. Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motorneurons. **Autophagy**, v. 9, n. 9, p. 1308-1320, 2013.

CHEN, S.; SAYANA, P.; ZHANG, X.; LE, W. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. **Mol Neurodegener**, v. 8, p. 28, 2013.

COMBS, G.F.Jr.; COMBS, S.B. The nutritional biochemistry of selenium. **Ann Rev Nut**, v. 4, p. 257-280, 1984.

EMANUELE, E. Can trehalose prevent neurodegeneration? Insights from experimental studies. **Current Drug Targets**, v. 15, 2014.

EPSTEIN, J.; GERSHON, D. Studies on aging in nematodes. The effect of antioxidants on cellular damage and lifespan. **Mech Ageing Dev**, v. 1, p. 257-264, 1972.

GOLDSTEIN, P.; MODRIC, T. Transgenerational, ultrastructural analysis on the antioxidant effects of tocopherol on early gametogenesis in *C. elegans* grown in 100% oxygen. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 124, p. 212-220, 1994.

HELMCKE, K.; ÁVILA, D.S.; ASCHNER, M. Utility of *Caenorhabditis elegans* in high-throughput neurotoxicology research. **Neurotoxicol Teratol**, v. 32, p. 62-67, 2010.

HOLDEN, D.H.; SMITH, A.M. The diverse role of selenium within selenoproteins: A review. **J Am Dietetic Assoc**, v. 99, n. 1, p. 836-843, 1999.

HONDA, Y.; TANAKA, M.; HONDA, S. Trehalose extends longevity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, v. 9, n. 4, p. 558-69, 2010.

KERMAN, A.; LIU, H.N.; CROUL, S.; BILBAO, J.; ROGAEVA, E.; ZINMAN, L.; ROBERTSON, J.; CHAKRABARTTY, A. Amyotrophic lateral sclerosis is a non-amyloid disease in which extensive misfolding of SOD1 is unique to the familial form. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 3, p. 335-44, 2010.

LAFERRIERE, F.; POLYMENIDOU, M. Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. **Swiss Med Wkly**, v. 145, p. w14054, 2015.

NIKI, E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. **Free Radic Biol Med**, v. 66, p. 3-12, 2014.

NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Chem Rev**, v. 104, n. 12, p. 6255-6285, 2004.

NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B. Toxicology and pharmacology of selenium: Emphasis and synthetic Organoselenium compounds. **Arch Tox**, v. 85, n. 11, p. 1313-1359, 2011.

O'HERN, P.; SIMON, J.; HART, A. Decrease SOD1 function in a precise *C. elegans* ALS model leads to defective synaptic transmission and stress-induced neurodegeneration. **Annals 20th Intern Meeting C. elegans**, 2015.

PINZ, M.; REIS, A.S.; DUARTE, V.; da ROCHA, M.J.; GOLDANI, B.S.; ALVES, D.; SAVEGNANO, L.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A. 4-phenylselenenyl-7chloro quinolines, a new quinolines derivate containing selenium, has potencial antinociceptive and anti-inflammatory actions. **Eur J Pharmacol**, v. 780, p. 122-128, 2016,

PUNTEL, R.L.; ÁVILA, D.S.; ROOS, D.H.; PINTON, S. Mitochondrial effects of organoselenium and organotellurium compounds. **Curr Organ Chem**, v. 20, n. 2, p. 198-210, 2016.

RIBEIRO, M. C.; ÁVILA, D.S.; SCHNEIDER, C.Y.M.; HERMES, F.S.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; RUBIN, M.A.; LEHMANN, M.; KRIEGLSTEIN, J.; MELLO, C.F. alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. **Epilepsy Res**, v. 66, n. 1-3, p. 185-94, 2005.

SALGUEIRO, W.G.; XAVIER, M.C.; DUARTE, L.F.; CÂMARA, D.F.; FAGUNDEZ, D.A.; SOARES, A.T.; PERIN, G.; ALVES, D.; ÁVILA, D.S. Direct synthesis of 4-organylsulfonyl-7-chloro quinolines and their toxicological and pharmacological activities in *Caenorhabditis elegans*. **Eur J Med Chem**, v. 75, p. 448-459, 2014.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans*. **WormBook**, p. 1-11, 2006.

VOISINE, C.; HART, A. *Caenorhabditis elgans* as a model system for triplet repeat disease. **Meth Mol Biol**, v. 277, p. 141-160, book IV, 2004

WANG, H.; O'REILLY, E.J.; WEISSKOPF, M.G.; LOGROSCINO, G.; McCULLOUGH, M.L.; SCHATZKIN, A.; KOLONEL, L.N.; ASCHERIO, A. Vitamin E intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a pooled analysis of data from 5 prospective cohort studies. **Am J Epidemiol**, v. 173, n. 6, p. 595-602, 2011.

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., ÁVILA D.S. Seleno- and Telluro-xylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C.elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. **Food Chem Toxicol**, vol. 64, p. 192-199, 2014.

6. CONCLUSÕES

- As doses utilizadas nos experimentos, dos diferentes compostos, na análise da paralisia e efeitos deletérios relacionados a ELA, de trealose associada à vitamina E, quanto dos organocompostos de selênio e telúrio não melhorou a expectativa de vida dos nematoides
- A exposição a esses diferentes compostos também não conseguiu retardar o aparecimento da paralisia nos vermes
- O tratamento com os organocompostos de selênio e telúrio não conseguiram reverter o dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio

7. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores são:

- testar novas alternativas terapêuticas no tratamento da Esclerose Lateral Amiotrófica utilizando cepas de *C. elegans* transgênicas

- verificar se a formulação de nanocápsulas contendo trealose e vitamina E além de outros compostos nanoencapsulados seria uma melhor maneira de expor os animais, evitando degradação destas moléculas nas placas e permitir o tratamento crônico

REFERÊNCIAS

ANDRUS, P.K.; FLECK, T.J.; GURNEY, M.E.; HALL, E.D. Protein oxidative damage in a transgenic mouse of familial amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurochem**, v. 71, n. 5, p. 2041-48, 1998.

ÁVILA, D.S.; BENEDETTO, A.; AU, C.; MANARIN, F.; ERIKSON, K.; SOARES, F.A.; ROCHA, J.B.T.; ASCHNER, M. Oganotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *C. elegans* by preventing oxidative stress. **Free Radic Biol Med**, v. 52, n. 9, p. 1903-1910, 2012.

AZBILL, R.D.; MU, X.J.; BRUCEKELLER, A.J.; MATTSON, M.P.; SPRINGER, J.E. Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. **Brain Res**, v. 765, n, p. 283-290, 1997.

BELEZA-MEIRELES, A.; AL-CHALABI, A. Genetic studies of amyotrophic lateral sclerosis: controversies and perspectives. **Amyotroph Lateral Scler**, v. 10, n. , p. 1-14, 2009.

BENEDETTO, A.; AU, C.; ÁVILA, D.S.; MILATOVIC, D.; ASCHNER, M. Extracellular dopamine potentiates Mn-induced oxidative stress, lifespan reduction and dopaminergic neurodegeneration in a BLI-3-dependent manner in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genet**, v. 6, n. 8, p, 2010.

BERGEMALM, D.; FORSBERG, K.; SRIVASTAVA, V.; GRAFFMO, K.S.; ANDESEN, P.M.; BRÄNNSTRÖM, T.; WINGLE, G.; MARKLUND, S.L. Superoxide dismutase-1

and other proteins in inclusions from transgenic amyotrophic lateral sclerosis model mice. **J Neurochem**, v. 114, n. 2, p. 408-418, 2010.

BOCCITTO, M.; LAMITINA, T.; KALB, R.G. Daf-2 signaling modifies mutant SOD1 toxicity in *C. elegans*. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33494, 2012.

BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

BROCKINGTON, A.; WHARTON, S.B.; FERNANDO, M.; GELSTHORPE, C.H.; BAXTER, L.; INCE, P.G.; LEWIS, C.E.; SHAW, P.J. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the central nervous system in amyotrophic lateral sclerosis. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 65, n. 1, p. 26-36, 2006.

CASTILLO, K.; NASSIF, M.; VALENZUELA, V.; ROJAS, F.; MATUS, S.; MERCADO, G.; COURT, F.A.; van ZUNDERT, B.; HETZ, C. Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. **Autophagy**, v. 9, n. 9, p. 1308-1320, 2013.

CHALFIE, M.; TU, Y.; EUSKIRCHEN, G.; WARD, W.W.; PRASHER, D.C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, n. 5148, p. 802-805, 1994.

CHEAH, S.; VUCIC, S.; KRISHNAN, A.V.; KIERNAN, M.C. Riluzole, neuroprotection and amyotrophic lateral sclerosis. **Curr Med Chem**, v. 17, n. 18, p. 1942-1949, 2010.

CHEN Q.; HADDAD GG, Role of trehalose phosphate synthase and trehalose during hypoxia: from flies to mammals. **J Exp Biol**, v. 207, p. 3125-29, 2004.

CHEN, S.; SAYANA, P.; ZHANG, X.; LE, W. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. **Mol Neurodegener**, v. 8, p. 28, 2013.

COMBS, G.F.Jr.; COMBS, S.B. The nutritional biochemistry of selenium. **Ann Rev Nut**, v. 4, p. 257-280, 1984

CULETTO, E.; SATTELLE, D.B. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. **Hum Mol Genet**, vol. 9, n. 6, p. 869-877, 2000.

CZAPLINSKI, A.; YEN, A.A.; SIMPSON, E.P.; APPEL, S.H. Slower disease progression and prolonged survival in contemporary patients with amyotrophic lateral sclerosis: is the natural history of amyotrophic lateral sclerosis changing? **Arch Neurol**, v. 63, n. 8, p. 1139-1143, 2006.

DESNUELLE, C.; DIB, M.; GARREL, C.; FAVIER, A. A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group. **Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord**, v. 2, n. 1, p. 9-18, 2001.

ERNST, I.M.; PALLAUF, K.; BENDALL, J.K.; PAULSEN, L.; NIKOLAI, S.; HUEBBE, P.; ROEDER, T.; RIMBACH, G. Vitamin E supplementation and lifespan in model organisms. **Ageing Res Rev**, v. 12, n. 1, p. 365-375, 2013.

FERRANTE, R.J.; BROWNE, S.E.; SHINOBU, L.A.; BOWLING, A.C.; BAIK, M.J.; MACGARVEY, U.; KOWALL, N.W.; BROWN, R.H. Jr.; BEAL, M.F. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurochem**, v. 69, n. 5, p. 2064-2074, 1997.

FORSBERG, K.; JONSSON, P.A.; ANDERSEN, P.M.; BERGEMALM, D.; GRAFFMO, K.S.; HULTDIN, M.; JACOBSSON, J.; ROSQUIST, R.; MARKLUND, S.L.; BRÄNNSTRÖM, T. Novel antibodies reveal inclusions containing non-native SOD1 in sporadic ALS patients. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11552, 2010.

GAMI, M. S.; WOLKOW, C. A. Studies of *Caenorhabditis elegans* DAF-2/insulin signaling reveal targets for pharmacological manipulation of lifespan. **Aging Cell**, v. 5, n. 1, p. 31-7, 2006.

GELINAS, D. Effects of the early diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis on the patient: advantages. **Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord**, v. 1 Suppl 1, p. S73-4, 2000.

GRAF, M.; ECKER, D.; HOROWSKI, R.; KRAMER, B.; RIEDERER, P.; GERLACH, M.; HAGER, C.; LUDOLPH, A.C.; BECKER, G.; OSTERHAGE, J.; JOST, W.H.; SCHRANK, B.; STEIN, C.; KOSTOPOULOS, P.; LUBIK, S.; WEKWERTH, K.; DENGLER, R.; TROEGER, M.; WUERZ, A.; HOGE, A.; SCHRADER, C.; SCHIMKE, N.; KRAMPFL, K.; PETRI, S.; ZIERZ, S.; EGER, K.; NEUDECKER, S.; TRAUPELLER, K.; SIEVERT, M.; NEUNDÖRFER, B.; HECHT, M. High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: results of a placebo-controlled double-blind study. **J Neural Transm**, v. 112, n. 5, p. 649-60, 2005.

GUERRERO, A. L.; DORADO-MARTÍNEZ, C.; RODRIGUEZ, A.; PEDROZA-RÍOS, K.; BORGONIO-PÉREZ, G.; RIVAS-ARANCIBIA, S. Effects of vitamin E on ozone-induced memory deficits and lipid peroxidation in rats. **Neuroreport**, v. 10, n. 8, p. 1689-92, 1999.

GURNEY, M.E.; CUTTING, F.B.; ZHAI, P.; DOBLE, A.; TAYLOR, C.P.; ANDRUS, P.K.; HALL, E.D. Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Ann Neurol**, v. 39, n. 2, p. 147-157, 1996.

HOLDEN, D.H.; SMITH, A.M. The diverse role of selenium within selenoproteins: A review. **J Am Dietetic Assoc**, v. 99, n. 1, p. 836-843, 1999.

HONDA, Y.; TANAKA, M.; HONDA, S. Trehalose extends longevity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, v. 9, n. 4, p. 558-69, 2010.

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, 2006.

KERMAN, A.; LIU, H.N.; CROUL, S.; BILBAO, J.; ROGAEVA, E.; ZINMAN, L.; ROBERTSON, J.; CHAKRABARTTY, A. Amyotrophic lateral sclerosis is a non-amyloid disease in which extensive misfolding of SOD1 is unique to the familial form. **Acta Neuropathol**, v. 119, n. 3, p. 335-44, 2010.

KIKAWADA, T.; SAITO, A.; KANAMORI, Y.; NAKAHARA, Y.; IWATA, K.; TANAKA, D.; WATANABE, M.; OKUDA, T. Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 28, p. 11585-90, 2007.

LACOMBLEZ, L.; BENSIMON, G.; LEIGH, P.N.; GUILLET, P.; MEININGER, V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. **Lancet**, v. 347, n. 9013, p. 1425-31, 1996.

LACOMBLEZ, L.; PIQUARD, A.; VERCELLETTO, M. Amyotrophic lateral sclerosis: cognitive and behavioral evaluation. **Rev Neurol (Paris)**, v. 162 Spec No 2, p. 4S145-4S150, 2006.

LAFERRIERE, F.; POLYMENIDOU, M. Advances and challenges in understanding the multifaceted pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. **Swiss Med Wkly**, v. 145, p. w14054, 2015.

LI, J.; HUANG, K. X.; LE, W. D. Establishing a novel *C. elegans* model to investigate the role of autophagy in amyotrophic lateral sclerosis. **Acta Pharmacol Sin**, v. 34, n. 5, p. 644-50, May 2013.

LI, Y.; LI, Y.; WU, Q.; YE, H.; SUN, L.; YE, B.; WANG, D. High concentration of vitamin E decreases thermosensation and thermotaxis learning and the underlying mechanisms in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71180, 2013.

LINDEN Jr, E. Prevalência de esclerose lateral amiotrófica no estado do Rio Grande do Sul. **Dissertação de Mestrado**, PPG Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, 2012.

MILATOVIC, D.; GUPTA, R.C.; YU, Y.; ZAJA-MILATOVIC, S.; ASCHNER, M. Protective effects of antioxidants and anti-inflammatory agents against manganese-induced oxidative damage and neuronal injury. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 256, n. 3, p. 219-26, 2011.

NIKI, E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. **Free Radic Biol Med**, v. 66, p. 3-12, 2014.

NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B. Organoselenium and organotellurium compounds: Toxicology and pharmacology. **Chem Rev**, v. 104, n. 12, p. 6255-6285, 2004.

NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B. Toxicology and pharmacology of selenium: Emphasis and synthetic Organoselenium compounds. **Arch Tox**, v. 85, n. 11, p. 1313-1359, 2011.

O'HERN, P.; SIMON, J.; HART, A. Decrease SOD1 function in a precise *C. elegans* ALS model leads to defective synaptic transmission and stress-induced neurodegeneration. **Annals 20th Intern Meeting C. elegans**, 2015.

PAILLISSE, C.; LACOMBLEZ, L.; DIB, M.; BENSIMON, G.; GARCIA-ACOSTA, S.; MEININGER, V. Prognostic factors for survival in amyotrophic lateral sclerosis patients treated with riluzole. **Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord**, v. 6, n. 1, p. 37-44, 2005.

POLKEY, M.I.; LYALL, R.A.; MOXHAM, J.; LEIGH, P.N. Respiratory aspects of neurological diseases. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 66, p. 5-15, 1999.

PUNTEL, R.L.; ÁVILA, D.S.; ROOS, D.H.; PINTON, S. Mitochondrial effects of organoselenium and organotellurium compounds. **Curr Organ Chem**, v. 20, n. 2, p. 198-210, 2016.

RIBEIRO, M. C.; ÁVILA, D.S.; SCHNEIDER, C.Y.M.; HERMES, F.S.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; RUBIN, M.A.; LEHMANN, M.; KRIEGLSTEIN, J.; MELLO, C.F. alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. **Epilepsy Res**, v. 66, n. 1-3, p. 185-94, 2005.

SALGUEIRO, W.G.; XAVIER, M.C.; DUARTE, L.F.; CÂMARA, D.F.; FAGUNDEZ, D.A.; SOARES, A.T.; PERIN, G.; ALVES, D.; ÁVILA, D.S. Direct synthesis of 4-organylsulfenyl-7-cloro quinolines and their toxicological and pharmacological activities in *Caenorhabditis elegans*. **Eur J Med Chem**, v. 75, p. 448-459, 2014.

SEKI, T.; ABE-SEKI, N.; KIKAWADA, T.; TAKAHASHI, H.; YAMAMOTO, K.; ADACHI, N.; TANAKA, S.; HIDE, I.; SAITO, N.; SAKAI, N. Effect of trehalose on the properties of mutant {gamma}KC, which causes spinocerebellar ataxia type 14, in neuronal cell lines and cultured Purkinje cells. **J Biol Chem**, v. 285, n. 43, p. 33252-64, 2010.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, n. 5271, p. 59-63, 1996.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *C. elegans*. **WormBook**, p. 1-11, 2006.

TANAKA, M.; MACHIDA, Y.; NIU, S.; IKEDA, T.; JANA, N.R.; DOI, H.; KUROSAWA, M.; NEKOOKI, M.; NUKINA, N. Trehalose alleviates polyglutamine-mediated pathology in a mouse model of Huntington disease. **Nat Med**, v. 10, n. 2, p. 148-54, 2004.

TOME, A. R.; FENG, D.; FREITAS, R. M. The effects of alpha-tocopherol on hippocampal oxidative stress prior to in pilocarpine-induced seizures. **Neurochem Res**, v. 35, n. 4, p. 580-7, 2010.

VAN RAAMSDONK, J. M.; HEKIMI, S. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS Genet**, v. 5, n. 2, p. e1000361, 2009.

WANG, H.; O'REILLY, E.J.; WEISSKOPF, M.G.; LOGROSCINO, G.; McCULLOUGH, M.L.; SCHATZKIN, A.; KOLONEL, L.N.; ASCHERIO, A. Vitamin E intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis: a pooled analysis of data from 5 prospective cohort studies. **Am J Epidemiol**, v. 173, n. 6, p. 595-602, 2011.

WANG, Z.; JOSHI, A.M.; OHNAKA, K.; MORITA, M.; TOYOMURA, K.; KONO, S.; UEKI, T.; TANAKA, M.; KAKEJI, Y.; MAEHARA, Y.; OKAMURA, T.; IKEJIRI, K.; FUTAMI, K.; MAEKAWA, T.; YASUNAMI, Y.; TAKENAKA, K.; ICHIMIYA, H.; TERASAKA, R. Dietary intakes of retinol, carotenes, vitamin C, and vitamin E and colorectal cancer risk: the Fukuoka colorectal cancer study. **Nutr Cancer**, v. 64, n. 6, p. 798-805, 2012.

WANGKHEIMAYUM, S.; KUMAR, S.; SURI, V. Effect of Vitamin E on sP-Selectin Levels in Pre-Eclampsia. **Indian J Clin Biochem**, v. 26, n. 2, p. 169-71, 2011.

WIESEKERA, L.C.; LEIGH, P.N. Amyotrophic lateral sclerosis. **Orphanet J Rare Dis**, v. 4, n. , p. 1-22, 2009.

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., ÁVILA D.S. Seleno- and Telluroxylofuranosides attenuate Mn-induced toxicity in *C.elegans* via the DAF-16/FOXO pathway. **Food Chem Toxicol**, vol. 64, p. 192-199, 2014.

ZARATE, C. Riluzole in psychiatry: a systematic review of the literature. **Expert Opin Dug Metab Toxicol**, v. 4, n. 9, p. 1223-1234, 2008.

PARTE TRÊS

ANEXO A

Artigo desenvolvido em paralelo durante o Mestrado, submetido e aceito pelo periódico Arabian Journal of Chemistry