

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

FLÁVIA SUELEN DE OLIVEIRA PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DA SEGURANÇA E POTENCIAL EFICÁCIA DE
SELENOÉSTERES EM UM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER EM
*CAENORHABDITIS ELEGANS***

**Uruguiana
2020**

FLÁVIA SUELEN DE OLIVEIRA PEREIRA

**DETERMINAÇÃO DA SEGURANÇA E POTENCIAL EFICÁCIA DE
SELENOÉSTERES EM UM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER EM
*CAENORHABDITIS ELEGANS***

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

Orientadora: Daiana Silva de Ávila

Coorientadora: Caroline Brandão Quines

**Uruguiana
2020**

FLÁVIA SUELEN DE OLIVEIRA PEREIRA

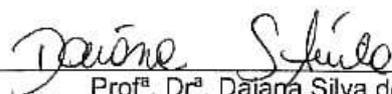
**DETERMINAÇÃO DA SEGURANÇA E POTENCIAL EFICÁCIA DE
SELENOÉSTERES EM UM MODELO DE DOENÇA DE ALZHEIMER EM
CAENORHABDITIS ELEGANS**

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

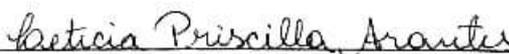
Área de Concentração: Bioprospecção Molecular

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 09 de março de 2020.

Banca examinadora:



Prof^ª. Dr^ª. Daiana Silva de Ávila
Orientador
UNIPAMPA



Prof^ª. Dr^ª. Leticia Priscilla Arantes
UNIPAMPA

Prof^ª. Dr^ª. Riva de Paula Oliveira
UFRN

Dedico este trabalho
à todos que de alguma forma contribuíram para sua elaboração.

AGRADECIMENTO

Primeiramente agradeço a meus pais por me apoiarem nessa trajetória acadêmica e pelos ensinamentos e princípios passados, que me ajudaram a chegar até aqui. E ao meu irmão Oberdan.

A minha cachorra Pipeta pelo carinho e amor incondicional.

A minha orientadora Daiana Ávila pela oportunidade e confiança em elaborar esse projeto junto ao grupo GBToxCe, pelos ensinamentos dentro e fora do laboratório. Pelo seu entusiasmo em sempre incentivar o grupo na carreira científica e em participar das reuniões de “integração” pós-expediente.

A minha coorientadora, Caroline Quines, pela paciência, amizade e pela disponibilidade de ficar até tarde da noite no laboratório fazendo companhia a mim e ao Gleysson (principalmente), auxiliando nos experimentos.

Ao Gabriel pela companhia e carinho, e por compartilhar os momentos de elaboração e defesa da dissertação

Agradeço também aos meus colegas de laboratório pela amizade, ajuda e pelo tempo e momentos em que passamos juntos, fora e dentro do laboratório. Além de todos os ensinamentos compartilhados. Muito obrigada!

Agradeço ao pessoal do grupo LabSelen – UFSC, pela parceria neste trabalho.

A UNIPAMPA pela oportunidade e suporte.

A CAPES, pela concessão de uma bolsa de estudos.

“Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso.”

Fernando Pessoa

RESUMO

A Doença de Alzheimer (DA) caracteriza-se como a principal causa de demência entre os idosos. Esta doença não tem cura, sendo que os fármacos disponíveis para o seu tratamento apresentam uma abrangência terapêutica limitada e, por este motivo, o desenvolvimento e avaliação de novos fármacos são necessários. Já foi demonstrado em modelos experimentais que alguns compostos orgânicos de selênio apresentaram efeitos em conter a manifestação da DA. Em estudos prévios *in vitro*, compostos derivados de dihidropirimidiononas, chamados de selenoésteres, demonstraram propriedades antioxidantes, quelante de metais e inibitória sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), o que os torna potenciais candidatos a um tratamento multialvo para a DA. Entretanto, os efeitos desses compostos ainda não foram demonstrados em modelos *in vivo*. Visando a avaliação destes, o *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) se mostra um modelo promissor, visto que há disponibilidade de cepas transgênicas que expressam e agregam o peptídeo beta-amilóide (A β) da mesma constituição dos agregados encontrados no cérebro de indivíduos que desenvolvem a doença. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos multialvo dos compostos selenoésteres na cepa GMC101, além de verificar os principais mecanismos de ação molecular destes. Para isso, inicialmente submetemos os vermes a uma exposição aguda (30min) aos compostos denominados FA83, FA84, FA85, FA86, FA87, FA88, FA90 e FA130 e 48 horas após o fim da exposição verificamos a porcentagem de vermes vivos. Após 48 horas do tratamento os vermes foram mantidos a uma temperatura superior a habitual (25°C) para que houvesse a expressão e agregação do A β . A partir disso realizamos os ensaios de postura de ovos, (24 horas após a exposição a 25°C), movimentos natatórios e taxa de paralisia (72 horas após a exposição da 25°C). Para verificarmos o efeito protetor dos compostos a longo prazo, realizamos o ensaio de longevidade. Também verificamos os efeitos dos compostos que se destacaram nos estudos prévios *in vitro* e *in vivo* (FA86, FA90 e FA130) sob aspectos relacionados a neurotransmissão no verme, através da atividade da enzima AChE. A partir dos resultados obtidos, buscamos o mecanismo de ação molecular dos selenoésteres via chaperonas e autofagia. Além disso, realizamos a marcação dos agregados de A β *in vivo* utilizando o corante X-34. Os dados foram analisados através do software

GraphPad Prism 7.0. Nas concentrações testadas (5, 10, 100 e 200 μ M) encontramos mortalidade significativa apenas nos animais tratados com os compostos FA86 e FA90 em 200 μ M. Por outro lado, o único composto que reduziu significativamente a taxa de vermes paralisados, após a indução da agregação do A β , foi o FA90 (200 μ M). Entretanto, esse efeito não foi capaz de estender o tempo de vida dos vermes tratados, onde somente o composto FA130 demonstrou efeito protetor durante o tempo de vida dos vermes. Os 3 compostos (FA86, FA90 e FA130) apresentaram efeito na sinalização colinérgica, melhorando a postura de ovos dos vermes submetidos a uma exposição com o agonista colinérgico levamisol. Entretanto, somente o composto FA90 reduziu a atividade da AChE, além de melhorar a taxa de movimentos dos vermes no ensaio de movimentos natatórios. Acredita-se que esses efeitos do FA90 via sinalização colinérgica, estejam intimamente relacionados a estrutura do composto, visto a capacidade do seu grupamento fenil livre em interagir com a enzima AChE. Além disso, o FA90 parece agir através de chaperonas ao induzir o aumento da expressão dos genes *hsp-6* e *hsp-4* em *C. elegans*. O composto FA90 foi, entre os selenoésteres avaliados, o que demonstrou melhor efeito em conter as manifestações fenotípicas da DA em modelo de *C.elegans*.

Palavras-Chave: acetilcolinesterase, beta-amiloide, chaperonas, dihidropirimidinonas, e selênio

ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized as the main cause of dementia among elderly. This disease has no cure, once the drugs available to the treatment, have a limited therapeutic range. It was already demonstrated in experimental models, the role of selenium organic compounds, to stop the effects caused by AD manifestation. In previous *in vitro* studies, dihydropyrimidinones compounds, known as selenoesters, demonstrated antioxidant and metals chelator properties, and inhibitory effect in the activity of acetylcholinesterase enzyme (AChE), which makes them potential candidates for multi-target treatment for the disease. However, the effects of these compounds, haven't been demonstrated *in vivo* models for the AD. Aiming to evaluate these, the *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) is a promisor model, since there are transgenic strains (example GMC101) that express and aggregate the beta-amyloid peptide (A β), in the same condition of the aggregates found in the brain of individuals that develop the disease. The objective of this study was evaluate the multi-target effects of selenoester compounds in the strain GMC101, and verify the main molecular mechanisms of action. For this, initially we submitted the worms in an acute exposition with the compounds FA83, FA84, FA85, FA86, FA87, FA88, FA90 e FA130 and 48 hours after we verify the rate of live worms. After 48 hours of treatment the worms were maintaining at a temperature higher than usual (25°C) for that there was the expression and aggregation of A β . From that assessed the egg-laying (24 hours after at 25°C), swimming and paralysis (72 hours after). To verify the protector effect of compounds during the lifespan, we performed the longevity assay. It was verified the effects of compounds that obtained better effects *in vitro* and *in vivo* studies (FA86, FA90 e FA130), under aspects related to neurotransmission in the worm, through measurement of AChE activity. From the results obtained, investigated the molecular mechanism of action of selenoesters via chaperones and autophagy. Besides that, performed the target of aggregates with dye X-34. The data were analyzed through the GraphPad Prism 7.0 software. In the concentrations tested (5, 10, 100 e 200 μ M) found only a significant mortality in the compounds FA86 and FA90 at 200 μ M. Being that one compounds that reduced significantly the rate of paralyzed worms, after the aggregation induction of A β , was the FA90 (200 μ M). However, this effect was not able to extend the lifespan of treated worms, where only the compound FA130, demonstrated protector effect in the

longevity of worms. When we tested the three compounds (FA86, FA90 and FA130) that demonstrate the better results *in vitro* and previous studies *in vivo*, all these had effect in the cholinergic signaling, improving the egg-laying of worms submitted to exposition with agonist cholinergic levamisole. However, only the compound FA90 reduced the AChE activity. Beside that the same improve the movements rate in the swimming assay of worms. Acting through chaperones by inducing the increase of genes expression *hsp-6* and *hsp-4* in *C.elegans*. The compound demonstrated the better effect in the contain the pathologic manifestations that mimic the AD in *C.elegans*.

Keywords: acetylcholinesterase, amyloid-beta, chaperones, dihydropyrimidinones, and selenium

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação encontra-se estruturada em três partes:

1° PARTE: as seções introdução, revisão bibliográfica, justificativa e objetivos geral e específicos.

2° PARTE: os resultados que compõem o presente trabalho serão apresentados no formato de artigo científico, estando as seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão contidas no manuscrito. O manuscrito o qual faz parte desta dissertação encontra-se estruturado no mesmo formato no qual será submetido à revista *Neuroscience*.

3° PARTE: nesta seção encontram-se as conclusões do presente trabalho bem como perspectivas futuras.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Hipometabolismo no cérebro de indivíduos com NCI (cognição normal), MCI (comprometimento cognitivo leve) e AD (demência associada a Doença de Alzheimer), através da tomografia por emissão de pósitrons (PET) utilizando 2-[18F]-fluoro-2-desoxi-D-glicose	22
Figura 2- Fatores idiopáticos que predisõem à DA	25
Figura 3- Mecanismo de fosforilação da proteína tau e formação dos emaranhados neurofibrilares (NFTs)	26
Figura 4- Mecanismo de clivagem da proteína precursora amiloide (APP)	27
Figura 5- Mecanismos de ação do Ebselen na redução de catalítica de peróxidos. .	37
Figura 6- Ciclo de vida do <i>Caenorhabditis elegans</i>	39

LISTA DE ABREVIATURAS

Caenorhabditis elegans- *C.elegans*

Escherichia coli- *E.coli*

μ L- Microlitros

μ M- Micromolar

Lys- Lisina

Leu- Leucina

mM- Milimolar

mm- Milímetros

fig- Figura

LISTA DE SIGLAS

(MeOPhSe)²- p,p'-metoxil-disseleneto de difenila
ACh- Acetilcolina
AChE- Acetilcolinesterase
AChEi- Inibidores da acetilcolinesterase
AD- Demência associada a Doença de Alzheimer
AGLs- Ácidos graxos livres
Al- Alumínio
AMC - Autofagia mediada por chaperonas
APL-1- Proteína precursora amilóide 1
ApoE- Apolipoproteína E
APP- Proteína precursora amiloide
AST- Aspartato aminotransferase
ALT- Alanina aminotransferase
ATP- Trifosfato de adenosina
A β - Peptídeo beta-amilóide
BHE- Barreira hemato-encefálica
ChAT- Colina acetiltransferase
Cu- Cobre
DA- Doença de Alzheimer
DCNTs- Doenças Crônicas não-transmissíveis
DHPMs- Dihidropirimidinonas
DMT1- Transportador divalente de metal 1
DNA- Ácido desoxirribonucleico
DPDS- Disseleneto de difenila
E1- Enzima ativadora de ubiquitina
E2- Enzima conjugadora de ubiquitina
E3- Enzima ligase de ubiquitina
EO- Estresse oxidativo
EROs- Espécies reativas de oxigênio
Fe- Ferro
GFP- Proteína verde fluorescente

GPx- Glutathione Peroxidase
HSPs- Proteínas de choque térmico
IGF-1- Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL-6 – Interleucina 6
IRs- Receptores de Insulina
MCI- Comprometimento cognitivo leve
Mn- Manganês
NCI- Cognição normal
NFTs- Emaranhados neurofibrilares
NGM- Meio de crescimento para nematoides
PET- Tomografia por emissão de pósitrons
Se- Selênio
Sec- Selenocisteína
SelP- Selenoproteína P
SNC- Sistema Nervoso Central
SOD- Superóxido dismutase
UPS- Ubiquitina Proteassoma
Zn- Zinco

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Memória e envelhecimento	19
2.2 Doença de Alzheimer	21
2.3 Terapias na Doença de Alzheimer.....	31
2.4 Compostos orgânicos de selênio	35
2.5 <i>Caenorhabditis elegans</i>	38
JUSTIFICATIVA.....	42
OBJETIVOS.....	43
4.1 Objetivos gerais.....	43
4.2 Objetivos específicos	43
MANUSCRITO	44
CONCLUSÕES	79
PERSPECTIVAS.....	80
REFERÊNCIAS.....	81

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas houve um crescente aumento da prevalência de idosos na população mundial e, concomitantemente, uma maior incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), que estão associados ao envelhecimento e prejudicam a qualidade de vida dos sujeitos acometidos. Dentre essas DCNTs estão as neurodegenerativas, que resultam principalmente em comprometimento cognitivo relacionado à memória (Ridley, Baker *et al.* 1986).

A Doença de Alzheimer (DA) é a principal causa de demência entre os idosos, afetando aproximadamente 47 milhões de pessoas no mundo todo (Ponjoan, Garre-Olmo *et al.* 2019). Esta doença neurodegenerativa caracteriza-se por alterações a nível cerebral, resultantes de modificações que ocorrem na homeostase proteica, com formação de placas neurotóxicas, além do quadro neurodegenerativo que ocasiona morte neuronal e conseqüentemente prejudica a sinalização de neurotransmissores. Conseqüentemente, isto resulta nos sinais e sintomas característicos da DA, como perda de memória, apatia, distúrbios do sono e alimentares (Amadoruge e Barnham 2011).

Ainda não foi desenvolvido um fármaco capaz de abranger todos os mecanismos patofisiológicos envolvidos na progressão da DA. As terapias atualmente disponíveis apresentam uma abrangência terapêutica limitada. Por isso, pesquisadores buscam novas drogas multialvo que possam atuar tanto nos mecanismos associados com o desenvolvimento da doença bem como na progressão desta. Dentre estas novas moléculas que estão sendo estudadas estão os compostos de organoselênio (Pinton, da Rocha *et al.* 2010, Barbosa, Canto *et al.* 2016, Cummings, Lee *et al.* 2019).

Existem vários estudos em animais demonstrando o papel neuroprotetor de compostos orgânicos de selênio em fase teste de estudos (Ishrat, Parveen *et al.* 2009, Zamberlan, Arantes *et al.* 2014, Barbosa, Canto *et al.* 2016, Xie, Tan *et al.* 2017, Martini, Rosa *et al.* 2019). Compostos selenoésteres derivados de dihidropirimidinonas demonstraram, em estudo *in vitro*, potencial ação multialvo para um provável tratamento da DA, com propriedades antioxidantes, quelante de metais e inibitória sobre a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE). Entretanto essas propriedades ainda não foram demonstradas em estudos *in vivo* (Barbosa, Canto *et al.* 2016).

O *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) é um nematoide amplamente utilizado para a avaliação de novos compostos candidatos a fármacos. Além disso, existem cepas transgênicas disponíveis para o estudo da DA. Estas cepas apresentam formação de agregados de peptídeo beta-amiloide ($A\beta$) em neurônios ou nos músculos do corpo. Fenotipicamente, peptídeos agregados causam um comprometimento locomotor nos vermes, resultando em um estado de paralisia. Com isso, é possível avaliar os efeitos farmacológicos na contenção e/ou consequências da formação dos agregados. Além disso, é possível visualizar *in vivo* a formação destes agregados através da utilização de um marcador derivado do vermelho do congo, o X-34 (1,4-bis(3-carboxi-4-hidroiphenil)etenil)-benzeno).

Na presente dissertação foi avaliada a segurança e eficácia de uma série de compostos selenoesteres, em um modelo *in vivo* de DA através de cepas transgênicas mutantes de *C. elegans* que expressam o peptídeo beta-amiloide ($A\beta_{1-42}$) humano. Além de estudar seus principais efeitos na contenção de manifestações fenotípicas, [também foram investigados os possíveis mecanismos de ação molecular destes compostos. Dentre os 8 compostos, 1 foi identificado como sendo mais promissor, o qual age na homeostase proteica via chaperonas com redução dos efeitos desencadeados pela expressão do $A\beta$ e na sinalização colinérgica através do aumento da atividade da enzima acetilcolinesterase.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Envelhecimento e doenças neurodegenerativas

O envelhecimento é uma condição fisiológica intimamente relacionada a expectativa de vida. Nos últimos anos, devido às melhorias no acesso aos serviços de saúde e contenção das doenças infectocontagiosas, a prevalência de idosos na população mundial aumentou. Entretanto, o aumento da expectativa de vida não está diretamente relacionado com melhor qualidade de vida e saúde nesta população. Isso porque, paralelamente a este cenário atual, a prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs) entre os idosos aumentou. As DCNTs abrangem distúrbios metabólicos e cognitivos com várias etiologias, o que contribui para aumento dos casos de mortalidade e morbidade nessa população (Kennedy, Berger *et al.* 2014).

Uma das principais características da senescência são as alterações que surgem na memória e aprendizagem. Segundo Tulving e Craik (2000), caracteriza-se como memória a capacidade de relembrar eventos passados e trazer à tona fatos e ideias aprendidas. Ela pode ser de curto ou de longo prazo. O que diferencia uma da outra é o tempo de armazenamento das informações e experiências obtidas, ou seja, na memória de curto prazo essa função é limitada, tendo duração de segundos ou minutos. Já na de longo-prazo, o armazenamento da memória tem duração ilimitada (Jonides, Lewis *et al.* 2008).

O envelhecimento é uma das condições que predispõem a alterações em aspectos cognitivos. Todas as informações e aprendizados que absorvemos ao longo da vida são armazenadas no cérebro, sendo o hipocampo a principal área envolvida na memória. Essa informação só foi descoberta devido a pesquisadores encontrarem perda deste potencial após lesão no hipocampo, sendo esta uma das grandes descobertas na neurociência, dando início assim à compreensão de como todos os processos envolvendo a memória ocorrem (Anand e Dhikav 2012, Nyberg, Lövdén *et al.* 2012).

O tamanho e a integridade das estruturas cerebrais são fatores que influenciam na resposta individual à cognição. Uma das alterações estruturais a nível cerebral encontrada em indivíduos acometidos por doenças neurodegenerativas é a redução de áreas do cérebro como hipocampo e córtex. Isso demonstra uma relação entre o conteúdo íntegro destas áreas e as funções cognitivas (Atiya, Hyman *et al.*

2003).

Vários estudos com organismos modelos têm demonstrado os mecanismos associados com o envelhecimento, o que inclui dano a macromoléculas, alterações metabólicas, estresse oxidativo, inflamação, morte celular e desregulação na homeostase proteica, além de outras (Kennedy, Berger *et al.* 2014). Entre os modelos alternativos utilizados para elucidar estes mecanismos tem-se a *Drosophila melanogaster* e o *C.elegans*. Nesses modelos, mutações em alguns genes ou condições incomuns de habitação (altas temperaturas ou restrição dietética), implicam diretamente na longevidade destes animais. Isso envolve mecanismos associados às vias da sinalização da insulina e de mTOR, bem como ao processo de autofagia, por exemplo. Além disso, alterações a nível celular que implicam diretamente na função de proteínas e no material genético (DNA) têm sido exploradas (Bitto, Wang *et al.* 2015, Klaijs, Jayaraj *et al.* 2018).

Uma das teorias associadas ao envelhecimento é o encurtamento de telômeros, os quais desempenham um papel na diferenciação e no tempo de vida celular. Células microgлияis envolvidas na resposta imune primária a nível cerebral apresentam telômeros mais curtos devido ao envelhecimento (Scheffold, Holtman *et al.* 2016). Essas células, juntamente aos astrócitos, são capazes de produzir e liberar citocinas pró-inflamatórias em resposta a um estresse neuronal. Entretanto, acredita-se que no envelhecimento esse mecanismo de proteção encontra-se comprometido (Crowe, Tuzer *et al.* 2016).

Várias doenças neurodegenerativas comumente associadas ao envelhecimento implicam no acúmulo de proteínas anormais ou mal-formadas. Proteínas intracelulares sofrem constantemente mudanças conformacionais e desdobramentos, entretanto em alguns casos, ocorre a exposição de suas regiões hidrofóbicas. Com isso, estas tornam-se mais propensas a se agregarem com outras proteínas. Entretanto, em condições normais, existem moléculas que auxiliam na cobertura dessas regiões, impedindo esse processo. Além disso, há mecanismos envolvendo proteínas de reparo que são responsáveis por reconhecer esses defeitos e caso não haja o reparo, seja feita a destruição destas proteínas mal formadas (Koga, Kaushik *et al.* 2011).

A autofagia é uma das vias que é comprometida no envelhecimento, sendo relacionada principalmente à homeostase proteica e, portanto, está envolvida em mecanismos de neuroproteção. Nos casos de doenças neurodegenerativas, em que

há alteração na estabilidade de proteínas, genes envolvidos nesta via apresentam sua expressão aumentada. Em *C. elegans*, o gene *unc-51*, é um dos reguladores da autofagia no verme, mas também desempenha um papel no desenvolvimento de axônios (Crowe, Tuzer *et al.* 2016). Nesse mesmo modelo, o maior acúmulo intracelular da proteína precursora amiloide (APL-1) está associado a um aumento do comprometimento da autofagia e alteração em parâmetros comportamentais, como a aprendizagem (Florez-McClure, Hohsfield *et al.* 2007, Trunova e Giniger 2012). Isso demonstra que as alterações associadas ao processo de envelhecimento implicam diretamente nas manifestações cognitivas a nível neuronal.

2.2 A Doença de Alzheimer

As DCNTs afetam os indivíduos por um longo período de tempo. Entre os fatores de risco para o desenvolvimento destas estão os modificáveis (por exemplo hábitos relacionados ao estilo de vida) e não-modificáveis (condições hereditárias). Porém, essa classificação torna-se mais complexa quando as etiologias dessas doenças são mistas, tornando a abordagem de prevenção bastante complexa. Este é um cenário encontrado quando se engloba as doenças neurodegenerativas. Visto que estas não apresentam, na maioria das vezes, uma causa específica, existem fatores de risco relacionados que vão desde as alterações no metabolismo energético até produtos da microflora intestinal, além dos fatores genéticos que exercem um papel significativo na predisposição ao desenvolvimento destas doenças (Figura 2) (Cai, Cong *et al.* 2012, Silva, Segheto *et al.* 2017, Kowalski e Mulak 2019).

A Doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa progressiva e sem cura. Dentre as DCNTs, é responsável por 5% dos casos de morte prematura. Esta doença se caracteriza como um distúrbio neurodegenerativo que resulta na perda da memória e conseqüentemente da capacidade cognitiva (Collaborators 2019). A cognição é uma das funções relacionadas aos aspectos de comportamento, memória, linguagem e aprendizagem. Quando ocorre um declínio nos aspectos cognitivos, com potencial de prejudicar as funções diárias do indivíduo, tem-se o quadro de demência (Trojsi, Christidi *et al.* 2018). De acordo com o período em que se manifesta, pode ser classificada em precoce (<65 anos) ou tardia (>65anos). Existem várias teorias acerca dos mecanismos que levam ao quadro

neurodegenerativo na DA, o que resulta consequentemente neste déficit cognitivo (Wattmo e Wallin 2017).

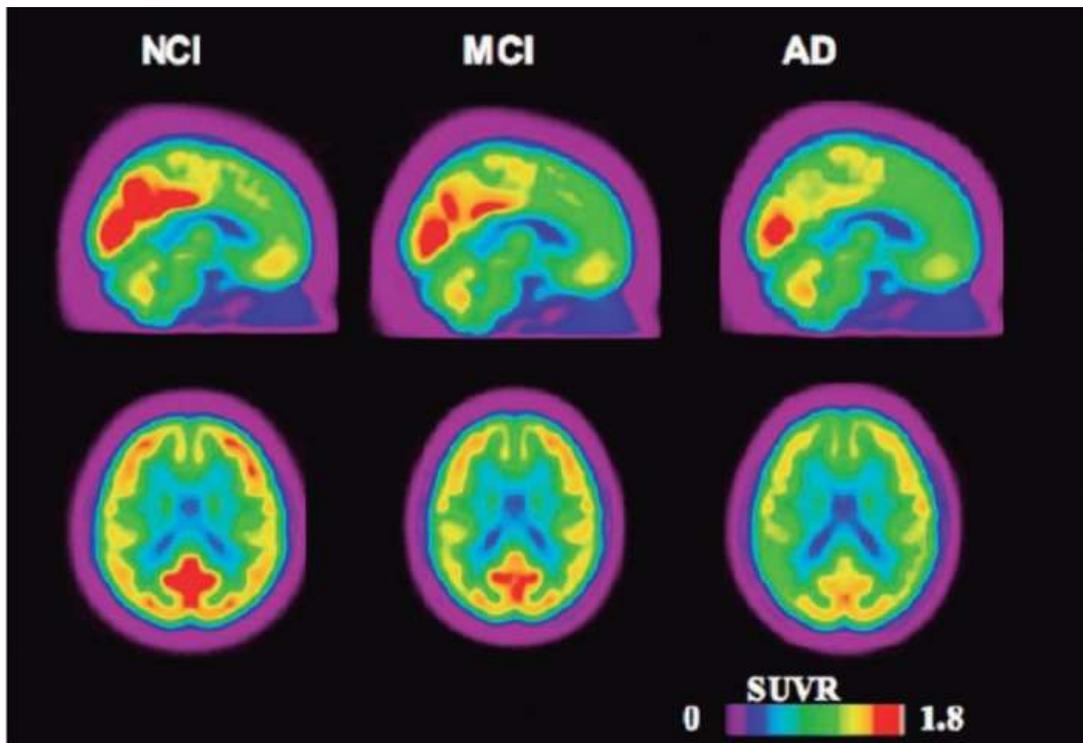


Figura 1: Hipometabolismo no cérebro de indivíduos com NCI (cognição normal), MCI (comprometimento cognitivo leve) e AD (demência associada a Doença de Alzheimer), através da tomografia por emissão de pósitrons (PET) utilizando 2 [18F]-fluoro-2-desoxi-D-glicose. Fonte: Schilling, Zimmer *et al.* (2016).

Uma das teorias já descritas é sobre o acúmulo de metais como Ferro (Fe), Alumínio (Al), Chumbo (Pb), Manganês (Mn), Zinco (Zn) e Cobre (Cu) em certas áreas cerebrais. Estes elementos são facilmente absorvidos por organismos vivos já que estão presentes na água e no solo, também em produtos industriais e de resíduos, o que facilita a exposição e consequentemente o acúmulo destes nos tecidos como o cérebro. Esses metais desempenham funções importantes para alguns mecanismos celulares, estando envolvidos na cadeia transportadora de elétrons, transporte de oxigênio, respostas imunes e síntese de neurotransmissores (Chen, Miah *et al.* 2016). Porém, metais como Cu e Zn, apresentam a capacidade de interferirem em moléculas associadas ao quadro fisiopatológico da DA, como o peptídeo A β (peptídeo beta-amilóide). Além disso, os níveis aumentados de Fe, por exemplo, contribuem para a produção de EROs (espécies reativas de oxigênio), e consequentemente estresse oxidativo (Piloni, Fernandez *et al.* 2013). Isso acaba contribuindo para o quadro neurodegenerativo, com disfunção neuronal e sináptica (Amadoruge e Barnham 2011).

Os processos metabólicos exercem grande efeito sob a geração de radicais livres e EROs. DCNTs de caráter metabólico, associado com diabetes e obesidade, acarretam em alteração na sinalização de insulina, quadro de hiperglicemia e hiperinsulinemia, geralmente acompanhado pelo aumento da produção de ácidos graxos livres (AGLs). No SNC (Sistema Nervoso Central), os neurônios necessitam de uma alta demanda energética, sendo a glicose sua principal fonte. Existem receptores de insulina (IRs) no hipocampo, bem como fatores de crescimento (IGF-1) dispostos em várias áreas do cérebro, sendo associados à integridade de células neuronais e plasticidade sináptica (Spinelli, Fusco *et al.* 2019). Este hormônio está envolvido na neuromodulação, sendo sua liberação no SNC regulada pelo neurotransmissor ACh (acetilcolina), que também estimula a captação de glicose para o cérebro (Molina, Rodriguez-Diaz *et al.* 2014). Desta maneira, a desregulação da sinalização da insulina está associada a déficits no metabolismo da ACh e glicose, com hipometabolismo a nível cerebral (Figura 1) (Matioli e Nitrini 2015).

Mutações no alelo variante $\epsilon 4$ do gene (apoE) que codifica a expressão glicoproteína apolipoproteína E (ApoE), envolvida no catabolismo de lipídeos e transporte de colesterol e fosfolipídeos a nível neuronal, corroboram com os mecanismos associados à fisiopatologia da DA. Sendo o cérebro o segundo local de maior liberação da ApoE (depois do fígado), sua síntese ocorre nos astrócitos e células microgliais (Fernandez, Hamby *et al.* 2019). A desregulação do conteúdo de colesterol celular (nos neurônios) está associada com a predisposição para o depósito de A β (beta-amilóide), sendo que este peptídeo pode ligar-se a essa lipoproteína. Portanto o aumento de esterol nas membranas celulares promove o aumento da produção deste peptídeo (Namba, Tomonaga *et al.* 1991). Além disso essa lipoproteína também encontra-se presente nos NFTs (emaranhados neurofibrilares) (Huang, Liu *et al.* 2001)

Como as defesas antioxidantes do SNC são bastante limitadas, e esta região é rica em ácidos graxos poli-insaturados susceptíveis à peroxidação lipídica, esses intermediários metabólicos acarretam na geração de EROs, o que contribui para a disfunção mitocondrial, exercendo um papel na patogênese da DA (Verdile, Keane *et al.* 2015, Hölscher 2019, Maciejczyk, Żebrowska *et al.* 2019).

Sabe-se que as mitocôndrias são as principais organelas responsáveis pela produção de EROs, sendo a disfunção mitocondrial um dos eventos que ocorrem no estágio inicial da DA. Entre os complexos da cadeia transportadora de elétrons, o IV

(citocromo oxidase) é o que apresenta redução de 50% em pacientes com DA, ocasionando em redução na produção de ATP (trifosfato de adenosina). O complexo II também é afetado, visto que há uma redução de sua atividade diretamente correlacionada à presença do A β . A importância dessa organela na DA é elucidada pelo fato de que a administração de compostos antioxidantes em modelos experimentais para a DA, resulta em uma melhora do quadro relacionado à neurodegeneração (Stefanello, Gubert *et al.* 2015, Andrade e Ramalho 2019).

Além desses mecanismos fisiopatológicos a nível celular, microorganismos bacterianos constituintes da flora intestinal também desempenham um papel na DA. Produtos oriundos do metabolismo bacteriano, como ácidos graxos de cadeia curta e até mesmo alguns neurotransmissores, podem atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e contribuir para a neuroinflamação e agregação de proteínas malformadas (Vogt, Kerby *et al.* 2017, Cerovic, Forloni *et al.* 2019). Além disso, algumas bactérias produzem proteínas amiloides, como é o caso da *Escherichia coli* (*E.coli*) que as utiliza para ligar-se a outros microrganismos e formar biofilmes, desencadeando uma resposta imune e liberação de substâncias neuroinflamatórias. Também, a flora microbiana é capaz de modular a ativação de células microgliais (Wang, Wang *et al.* 2018). A desregulação entre os microrganismos pró e anti-inflamatórios pode contribuir para a neuroinflamação e amiloidose; e portanto, o equilíbrio da manutenção da microbiota saudável auxilia na homeostase a nível cerebral (Jiang, Li *et al.* 2017, Kowalski e Mulak 2019).

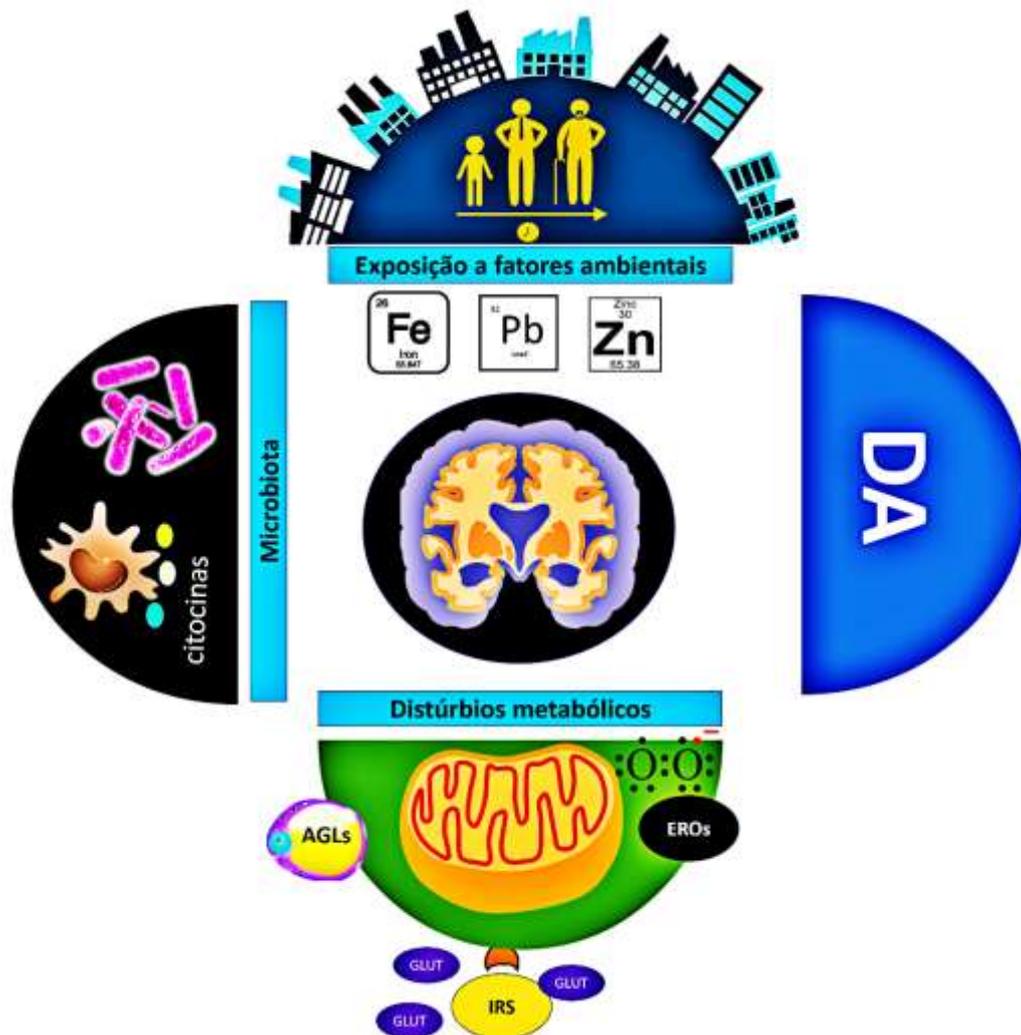


Figura 2: Fatores idiopáticos que predisõem à DA. AGLs: Ácidos Graxos Livres; IRS: Receptores de Insulina; GLUT: Transportador de Glicose; EROs: Espécies Reativas de Oxigênio. Fonte: própria autora.

Os danos intracelulares neuronais e a transmissão sináptica prejudicada na DA, estão associados também à desestabilização dos microtúbulos que auxiliam a manter a flexibilidade e integridade de axônios. Em condições normais, a proteína *tau* encontra-se associada aos microtúbulos e tem a função de os estabilizar e favorecer a transmissão sináptica (Figura 3). Entretanto, na DA essa proteína se desprende dos microtúbulos, sendo hiperfosforilada e posteriormente liberada na forma de fragmentos insolúveis que apresenta tendência à agregação e formação dos emaranhados neurofibrilares (NFTs), afetando as funções fisiológicas e morfológicas de neurônios (Liu *et al.* 2010).

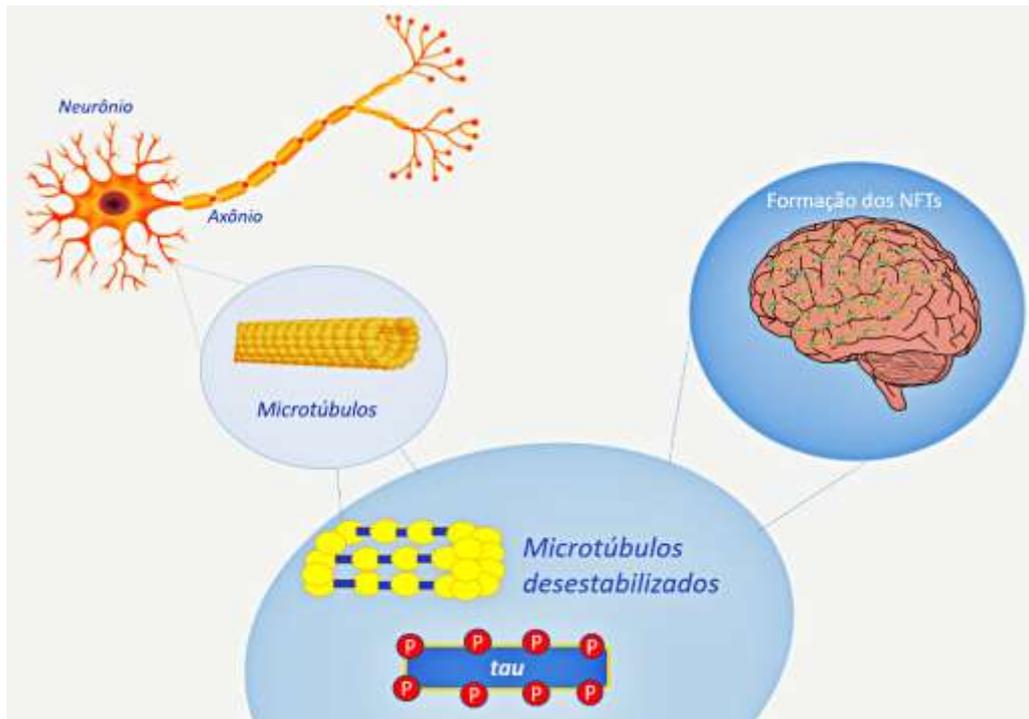


Figura 3: Mecanismo de fosforilação da proteína tau e formação dos emaranhados neurofibrilares (NFTs). Fonte: própria autora

A teoria amiloidogênica descreve o papel do $A\beta$ no quadro fisiopatológico que contribui para as manifestações clínicas da DA e também está associada à desregulação na homeostase proteica. Isso resulta principalmente do distúrbio na homeostase proteica, levando ao acúmulo dessas proteínas malformadas a nível cerebral, ocasionando a perda neuronal e atrofia cerebral, consequentemente prejudicando as sinapses. Entre essas proteínas tem-se a APP (proteína precursora amiloide), uma das mais abundantes no SNC. A APP é uma proteína transmembrana, com domínios citoplasmático e extracelular, sendo em humanos codificada por um gene que se localiza no cromossomo 21. Sua clivagem e processamento dependem da atividade de três enzimas conhecidas como secretases (α , β e γ). Em uma situação não patológica, a clivagem da APP pela enzima α -secretase entre o domínio Lys¹⁶ e Leu¹⁷ origina um fragmento carboxi-terminal C83, sendo liberada para a porção extracelular fragmentos da proteína APP que são solúveis (sAPP α) (Figura 4 A, via não-amiloidogênica) (Vingtdeux e Marambaud 2012).

Já a γ -secretase é uma enzima com atividade proteolítica que apresenta um complexo contendo as presenilinas 1 e 2 e nicastrina. Portanto, uma mutação ou defeito nestes genes pode ocasionar a clivagem incorreta da APP, propiciando o aumento da síntese de fragmentos insolúveis de $A\beta$. Sua ação sobre a APP ocorre

na sua porção c-terminal, após o processo de clivagem pelas enzimas α ou β secretase. A ação da enzima β -secretase envolve a via amiloidogênica, ou seja, aquela responsável pela formação do peptídeo A β . No primeiro processo de clivagem desta enzima, há a formação de uma porção N-terminal, do A β , e a c-terminal contendo o fragmento que está ligado C99. Posteriormente a γ -secretase separa essas porções, liberando o A β (Figura 4, B- via amiloidogênica) (O'Brien e Wong 2011).

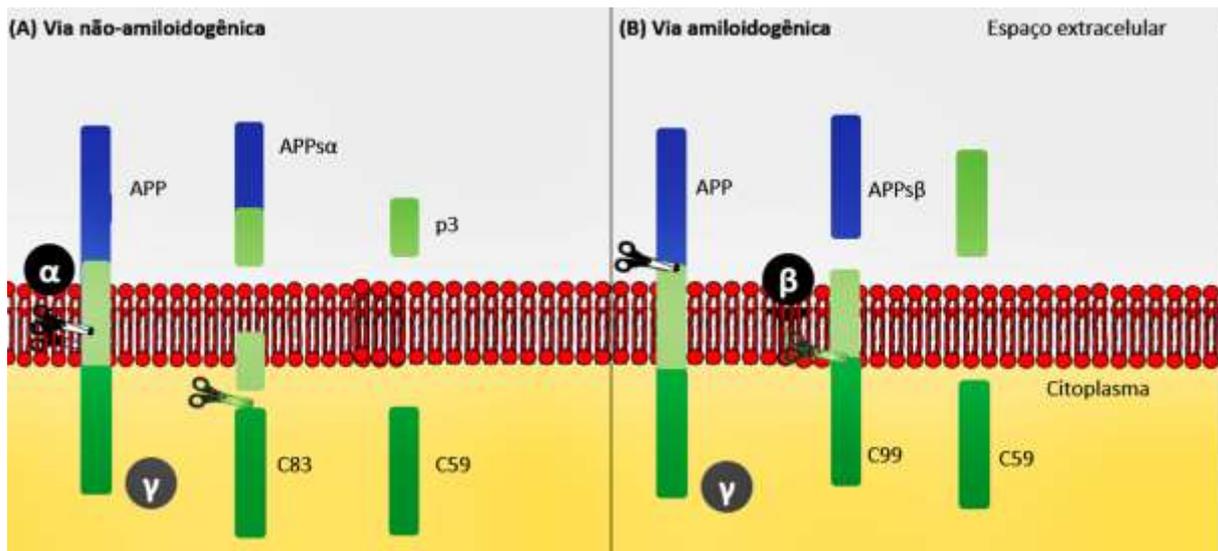


Figura 4: Mecanismo de clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Fonte: própria autora

Especula-se que o que delimita a enzima atuante (α ou β secretase) na porção N-terminal do A β é uma mutação genética, que leva à troca na sequência de códons que codificam para aminoácidos, de lisina para asparagina e de metionina para leucina, precisamente no local de clivagem da APP pela β -secretase (BACE1), na porção 99 aminoácidos após a extremidade C-terminal. A BACE1 é altamente presente nos neurônios e ao redor das placas amiloides, propiciando um círculo vicioso, entre a clivagem da APP e a presença do peptídeo. A presença desses agregados acarreta em uma sinalização pró-inflamatória, onde as citocinas liberadas também modulam a expressão da BACE1 (Cole e Vassar 2007).

Esses peptídeos A β organizam-se principalmente na forma de oligômeros, sendo predominantemente constituídos por 40-42 aminoácidos. O número de aminoácidos que constituem o peptídeo está proporcionalmente relacionado a toxicidade das placas. Estes por apresentarem características hidrofóbicas, agregam-se no espaço extracelular, formando placas conhecidas como senis ou amiloides (Chen, Xu *et al.*

2017).

O A β pode se acumular intracelularmente, precisamente nos neurônios, onde estudos demonstraram a presença desse peptídeo juntamente às NFTs nestas células. Além disso, é possível que haja a captação desse peptídeo do espaço extracelular para os neurônios, devido a sua capacidade de ligação a biomoléculas como lipídeos, proteínas e proteoglicanos. Sendo um dos fatores que leva à disfunção sináptica e morte neuronal, além de exercer um efeito inibitório sobre o sistema proteassoma, que auxilia na remoção dessas proteínas malformadas. Inibidores das secretases (γ e β) ou estimuladores para a α secretase têm sido usados como alvos terapêuticos para a DA (Bayer e Wirths 2010).

Algumas mutações genéticas estão envolvidas nesse processo de clivagem com formação do A β . As presenilinas (PS1 e PS2) constituem as subunidades catalíticas da enzima γ -secretase, mutações do gene *PSEN1*, que codifica a sua expressão, estão associadas com a DA de origem familiar, que geralmente se caracteriza como de início precoce (<65 anos). Já a DA de início tardio (>65 anos) está associada a uma mutação no gene que codifica a expressão da apolipoproteína E (ApoE), principalmente no alelo variante $\epsilon 4$, sendo esta lipoproteína presente de forma abundante no SNC. Esta mutação exacerba o acúmulo de A β no cérebro (Yamazaki, Zhao *et al.* 2019).

Os eventos neurotóxicos se devem à capacidade desse peptídeo de interagir com a membrana celular e formar poros, alterando sua permeabilidade. Conseqüentemente, ocorrem alterações na bicamada lipídica da célula prejudicando o processo de difusão, proporcionando uma modulação na atividade das β e γ secretases e estímulo à produção de A β . Todos esses danos ao constituinte lipídico de membrana acarretam na redução dos níveis de ATP neuronal, conseqüentemente ocasionando a morte neuronal e prejudicando a neurotransmissão (Evangelisti, Cascella *et al.* 2016).

Com a morte de neurônios, ocorre um prejuízo na síntese de neurotransmissores, entre eles a acetilcolina (ACh). Com isso, também ocorre uma redução nas enzimas envolvidas na sua síntese e degradação, colina acetiltransferase (ChAT) e acetilcolinestrerase (AChE). Inicialmente, a enzima ChAT realiza a conversão de colina e acetil-CoA em acetilcolina. Para cessar o estímulo colinérgico, ocorre a hidrólise da ACh através da ação da enzima AChE em acetato e colina, sendo este último produto reciclado pelos neurônios. Essa disfunção no

sistema colinérgico afeta a neuroplasticidade e as funções hemodinâmicas a nível cerebral, como processo de vasodilatação e fluxo sanguíneo. A nível comportamental são relatadas alterações do sono, déficit de atenção, dificuldade de aprendizagem e memória (Ferreira-Vieira, Guimaraes *et al.* 2016).

A principal alteração a nível molecular que desencadeia a desregulação na homeostase proteica envolve mecanismos associados ao sistema proteossomal e autofagia. A remoção e degradação das proteínas malformadas ocorre através do sistema ubiquitina-proteassoma (UPS), sendo a proteína ubiquitina dependente de ATP. A ativação desta é responsável pela cascata de eventos visando a manutenção da homeostase proteica. O início ocorre por meio a ubiquitinação, na qual a ubiquitina se liga às proteínas alvo através de três principais enzimas: E1 (enzima ativadora de ubiquitina), E2 (enzima conjugadora de ubiquitina) e E3 (enzima ligase de ubiquitina). A primeira enzima E1, irá se conjugar a ubiquitina, através do seu resíduo c-terminal, formando uma ligação tio éster. Posteriormente essa molécula, será transferida para a segunda enzima (E2), formando uma nova ligação tio éster. Sendo a terceira ligase (E3) a responsável por sinalizar e propiciar a ligação da ubiquitina a proteína alvo (Dikic 2017). Quando ocorre a marcação dessas proteínas através da ubiquitina, a degradação ocorre através do complexo proteolítico dependente de ubiquitina e ATP, conhecido como proteassoma 26S. Porém esse complexo só agirá quando a proteína-alvo for sinalizada quatro vezes (poliubiquitinação). Posteriormente ocorrerá a degradação da proteína marcada e liberação da ubiquitina para a reciclagem (Callis 2014).

A outra segunda maior via de degradação é a autofagia, que pode ser de três tipos: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas, sendo este último mecanismo um dos envolvidos na homeostase proteica. Assim como o sistema UPS, as chaperonas detectam essas proteínas malformadas e previnem a agregação, o que as tornam um dos mecanismos moleculares de ação para fármacos utilizados no tratamento da DA. Uma das chaperonas intimamente relacionadas à remoção de agregados proteotóxicos na DA pertence à família das proteínas de choque térmico 70 (HSP70) (Glick, Barth *et al.* 2010, Kaushik e Cuervo 2012).

Estas chaperonas apresentam a capacidade de interagir com as porções hidrofóbicas de peptídeos, além de uma porção C-terminal com afinidade a essas proteínas com má formação estrutural, além de serem dependentes de ATP. Isso

consequentemente protege contra a formação de agregados, além de favorecer a redistribuição da ubiquitina, pertencente ao sistema proteossomal. Os membros dessa família estão localizados em vários compartimentos celulares, como retículo endoplasmático, mitocôndria, núcleo e citoplasma, atuam também por um mecanismo conhecido como autofagia mediada por chaperonas (AMC) além da macro (autofagia) e microautofagia (Orenstein e Cuervo 2010, Kaushik e Cuervo 2012).

Nesse caso, a principal diferença entre a AMC e a macroautofagia é que a primeira não envolve a degradação de organelas celulares, mas sim, apenas proteínas. Já na macroautofagia, ocorre a formação de uma vesícula (autofagossomo) contendo o conteúdo citoplasmático a ser degradado, enquanto na microautofagia não há a formação desse invólucro, sendo o lisossomo a organela encarregada da invaginação desses componentes citosólicos (Glick, Barth *et al.* 2010). Basicamente, a AMC consiste na degradação de proteínas citosólicas, através dos lisossomos, onde há a interação com uma chaperonas pertencente à família das HSP70, a HSC70, sendo exclusivamente participante deste mecanismo. Junto ao seu substrato, a HSC70 é capaz de interagir com uma proteína lisossomal de membrana (LAMP-2A) e, nos lisossomos, esse complexo é degradado através de enzimas hidrolíticas (Kaushik e Cuervo 2018).

Alguns estudos demonstram a co-localização destas chaperonas em locais de acumulação do A β , sendo que a desregulação da autofagia é uma das alterações que predispõem à fisiopatologia da DA. A ligação da HSP70 à APP previne a formação dos peptídeos neurotóxicos oriundos da clivagem dessa proteína, promovendo um efeito neuroprotetor (Radons 2016, Lackie, Maciejewski *et al.* 2017, Campanella, Pace *et al.* 2018).

Sabe-se que os aglomerados do A β se encontram no espaço extracelular, sendo as HSPs expressas em organelas intracelulares. Entretanto, estudos já detectaram a presença de HSPs fora das células. Com o envelhecimento, os níveis de HSPs tendem a reduzir, e o peptídeo A β apresenta maior tendência à agregação com o passar de idade. Por isso, o equilíbrio entre a produção de chaperonas e os níveis do peptídeo pode contribuir para manter a homeostase proteica, impedindo a oligomerização (Rivera, Capone *et al.* 2018).

Visto que os mecanismos fisiopatológicos associados a DA estão elucidados, é possível determinar os fatores que predispõem ao desenvolvimento da doença e,

portanto, o desenvolvimento de terapias que ajam na sua causa. Os fármacos existentes para o tratamento da DA, limitam-se quanto à abrangência terapêutica, e atuam em mecanismos específicos, não levando em consideração a origem multifatorial da DA. Estratégias terapêuticas já comumente utilizadas bem como novos alvos terapêuticos, serão abordados a seguir.

2.3 Terapias na Doença de Alzheimer

Devido à complexidade da etiologia da DA, há uma dificuldade na busca por uma terapia-alvo envolvida em todos os mecanismos associados a patogênese da doença. Atualmente os fármacos bem descritos e amplamente utilizados são alguns inibidores da AChE (AChEi) e a memantina (droga antagonista não-competitiva que age na redução dos níveis de glutamato). Além disso, a busca crescente por novas terapias tem crescido, como fármacos anti-amiloide e anti-tau, mitocondriais e imunoterápicos, por exemplo. Essas terapias a nível de inibição da agregação proteica, tendem a agir via inibição de enzimas associadas a clivagem dessas proteínas (como as secretases e quinases), bem como modular sua degradação. Já a nível mitocondrial estão associadas à estabilidade das funções antioxidantes e a imunoterapia envolve a utilização de anticorpos específicos contra essas proteínas mal-formadas (Cummings, Lee *et al.* 2019).

As drogas com atividade inibitória sobre a enzima acetilcolinesterase (AChEi) são as mais comumente utilizadas e apresentam como principal mecanismo de ação impedir a atividade de quebra da ACh através da enzima AChE, potencializando a ação do neurotransmissor. Os sítios ativos dessa enzima apresentam duas regiões, uma aniônica (resíduo de triptofano) e outra esteárica (resíduo de histidina). Nesse primeiro sítio é onde ocorre a interação entre a ACh e enzima, devido à diferença de cargas positiva do N desse neurotransmissor com a carga negativa do resíduo de aspartato da AChE. Já no segundo sítio é onde ocorre a ligação (éster-hidrogênio) do substrato com a enzima (Colović, Krstić *et al.* 2013).

Entretanto, já está estabelecido que existem outros locais de ligação na AChE para seu substrato bem como para outras moléculas quaternárias. Seriam estes locais periféricos que se diferenciam do local de ligação do substrato, mas que possuem potencial para a ação de compostos inibitórios da AChE (AChEi) (Dvir, Silman *et al.* 2010). Drogas com esse potencial foram desenvolvidas visando o

tratamento de distúrbios colinérgicos, principalmente quando relacionados à DA.

Dentre os AChEi disponíveis para o tratamento da DA a Tacrina (Cognex®) foi uma das pioneiras, sendo aprovada e disponibilizada no ano de 1992. Entretanto, seus efeitos hepatotóxicos foram reportados já em 1994 (Watkins, Zimmerman *et al.* 1994). Posteriormente, em 1996, o Donazepil (Erantz®) foi outro AChEi liberado e aprovado, sendo utilizado para o tratamento da DA leve a moderada. Em 1997 a Rivastigmina (Exelon®) foi disponibilizada para administração oral ou transdérmica. Já nos anos 2000, a Galantamina (Razadyne®) foi aprovada, atuando também como um fármaco potencializador de receptores para ACh muscarínicos e nicotínicos (Galimberti e Scarpini 2016). Em *C.elegans* alguns alcaloides já mostraram efeito inibitório sobre a AChE bem como organoselênios (Xin, Yamujala *et al.* 2013, Stefanello, Gubert *et al.* 2015). A adesão ao tratamento auxilia na redução da taxa de deficit cognitivo. Porém, estes efeitos são limitados, uma vez que se observa uma melhor eficácia nos primeiros 12-24 meses de tratamento, e com altas doses. Como o quadro neurodegenerativo é progressivo, seus efeitos podem ser retardados, mas não interrompidos, sendo que a partir desse período a eficácia na contenção da progressão da DA já é limitada e os efeitos adversos agravam-se (Tayeb, Yang *et al.* 2012).

Entretanto, o principal problema dessa classe de drogas, principalmente a Tacrina, são seus efeitos colaterais mais agravantes como hepatotoxicidade, sendo relatados casos de icterícia, insuficiência hepática aguda, hepatite crônica ou síndrome do ducto biliar, além de outros problemas gastrointestinais (náuseas, vômitos ou diarreia). Não se sabe ao certo como ocorre a lesão hepática, mas como esse fármaco é metabolizado pelo sistema do citocromo P450, acredita-se que algum metabólito tóxico possa ser responsável pelos quadros de injúria hepática (Watkins, Zimmerman *et al.* 1994).

Durante a adaptação do paciente aos fármacos ocorre a administração de diferentes doses até se atingir uma dosagem com efeito terapêutico, e durante esse período os sintomas indesejáveis tendem a se instalar. Por exemplo, para o Donazepil, a dose inicial durante o período de adaptação é de 5mg, sendo posteriormente aumentada para 10mg, a dose máxima recomendada (Shin, Kim *et al.* 2018). Estas diferenças de dosagens, durante o período de ajuste da terapia, podem resultar em um aumento da biodisponibilidade plasmática destes fármacos, e conseqüentemente uma sobrecarga hepática inicial para sua eliminação,

propiciando alteração na atividade das enzimas hepáticas como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Portanto, a janela terapêutica destas drogas é bastante estreita (Grutzendler e Morris 2001).

Um estudo demonstrou baixa adesão ao tratamento nos primeiros 12 meses, onde entre 3.091 pacientes, somente 58,2% adeririam à terapia oral (Borah, Sacco *et al.* 2010). Após esse período, os pacientes que persistem no tratamento representam 40-54% dos que aderiram à terapia nos primeiros 12 meses (Herrmann, Binder *et al.* 2009). A idade acaba exercendo influência no nível de adesão, sendo que indivíduos com mais de 86 anos são mais persistentes durante o tratamento (Borah, Sacco *et al.* 2010). Além disso, dentre pacientes que acabam aderindo ao tratamento nem todos apresentam melhorias nos aspectos cognitivos. Por exemplo, um estudo demonstrou que apenas 21-38% dos pacientes que fizeram o uso de Donazepil apresentaram melhoria significativa nesse parâmetro (Lanctôt, Herrmann *et al.* 2003).

A memantina é um fármaco que age como antagonista do receptor de N-metil-D-aspartato de baixa a moderada afinidade (NMDAr), sendo prescrito entre as fases moderada a grave da doença. Apresenta entre outros efeitos colaterais o bloqueio das funções fisiológicas do receptor NMDA, alterando o balanço GABA/Glutamato. Seus efeitos colaterais incluem manifestações gastrointestinais associadas à constipação, tonturas, confusão e efeitos sedativos (Mimica and Presecki 2009). Inicialmente esta droga foi descrita para o tratamento do diabetes tipo 1 (Willenborg, Schmoller *et al.* 2011). Entretanto, posteriormente descobriu-se o seu efeito benéfico para várias doenças neurodegenerativas, como a DA. Como este fármaco é um antagonista do glutamato, age inibindo receptores excitatórios (ionotrópicos), através do bloqueio dos canais iônicos, prevenindo assim a lesão e morte neuronal, através da manutenção do fluxo de Ca^{2+} pelo canal iônico. Como o uso dessa droga costuma ser prescrito em uma fase mais avançada da DA, associa-se a terapia a um AChEi, mostrando-se assim uma terapia complementar eficaz em retardar o declínio cognitivo e funcional na doença (van Marum 2009).

Outros mecanismos terapêuticos abordados, envolvem moléculas com efeito anti-tau ou anti-amiloide. Impedir a agregação dessas proteínas pode minimizar os efeitos neurotóxicos causados por esses depósitos. Sabe-se que com relação ao $A\beta$, há enzimas envolvidas no seu processo de clivagem e formação das placas. O uso de inibidores da γ e β -secretase tem sido uma estratégia investigada. Estudos já

demonstraram que a depleção do gene BACE 1, em camundongos, que codifica para a enzima β -secretase, reduziu a produção de A β sem causar efeitos colaterais graves (Luo, Bolon *et al.* 2001). Entretanto, alguns dos principais problemas de novas moléculas que estão nas fases clínicas de teste mais avançadas, *in vivo*, são a baixa biodisponibilidade, curta meia-vida e capacidade de penetrar na BHE desfavorável (Liu, Xie *et al.* 2019).

Notavelmente, o uso de imunoterapia através de anticorpos direcionados contra o local de clivagem da APP pela BACE1, demonstram resultados promissores tanto *in vitro* quando em animais transgênicos, na redução da produção de A β e formação das placas (Re, Airoidi *et al.* 2010, Moussa 2017). A imunoterapia tem sido aplicada com o intuito de modular o sistema imune para combater os eventos patogênicos neurodegenerativos na DA. Estudos já demonstraram efeitos na redução da agregação do A β através do uso de imunoterapia com anticorpos em camundongos (Wilcock, Rojiani *et al.* 2004). Isso porque especula-se que haja uma dificuldade de penetração destes anticorpos via BHE, e por isso a redução de sua deposição não seja significativa (Davies e Koppel 2009). Já os resultados com imunoterapia para a *tau* parecem mais promissores quanto à eficácia e segurança. Um anticorpo, o AADvac-1, já em fase II de testes, demonstrou capacidade de redução dos biomarcadores associados a desregulação desta proteína, além de melhora na capacidade cognitiva (Godyń, Jończyk *et al.* 2016). A vacina com ACI-35 em camundongos foi capaz de deter os efeitos locomotores causados pelos depósitos da *tau*, sendo que testes para avaliar a tolerabilidade e imunogenicidade já estão sendo realizados em pacientes com DA. Entretanto ainda muito especula-se sobre a segurança deste método preventivo e o que a aplicação dessa intervenção precoce acarretará nos indivíduos (Bittar, Bhatt *et al.* 2020).

Como a DA caracteriza-se por um quadro patológico envolvendo mais de um mecanismo, a terapia combinada pelo uso de mais de um fármaco, também tem sido uma estratégia abordada. Alguns estudos descrevem a relação entre a *tau* hiperfosforilada e a aglomeração do A β . A curcumina e o Azul de metileno são compostos que apresentaram efeitos nas fases de testes clínicos iniciais, em aspectos cognitivos e nos biomarcadores de doença, entretanto a sua segurança e efeitos a longo prazo ainda estão sendo avaliados. Como no desprendimento da *tau* ocorre uma desestruturação dos microtúbulos, drogas com efeito estabilizador sobre essas estruturas têm sido estudadas como um alvo terapêutico para a DA. O

antifúngico epitilona D promoveu esse efeito em camundongos, além de manter a estrutura dos axônios. Entretanto esses candidatos acabam tendo seus testes clínicos interrompidos por desencadearem efeitos adversos (Congdon e Sigurdsson 2018).

A geração de EROs acompanhada da disfunção mitocondrial, resultantes do estresse oxidativo, são eventos associados a patogênese da DA. Portanto, drogas moduladoras com efeitos antioxidantes têm sido estudadas com uma estratégia terapêutica para a doença. Já foi demonstrada que a administração de CoezimaQ e MitoQ em modelos experimentais neurodegenerativos, tiveram um papel significativo na contenção da geração de EROs além do quadro neurodegenerativo (Bonda, Wang *et al.* 2009). O hormônio melatonina também exerce efeitos anti-apoptóticos induzidos pelo A β , além de manter a função mitocondrial com redução das EROs, melhorando a cognição de camundongos e reduzindo a produção de citocinas inflamatórias (Wang e Chen 2016).

Entretanto, os principais fatores que influenciam na adesão e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica, são a dose utilizada dos fármacos, a idade do paciente e os prováveis efeitos adversos que estes desencadeiam. Levando ainda em consideração que poucos medicamentos são capazes de impedir a progressão da doença, novas estratégias terapêuticas são necessárias, visando uma margem terapêutica mais abrangente, promovendo assim melhor eficácia e adesão ao tratamento (Campbell, Dexter *et al.* 2013).

2.4 Compostos orgânicos de Selênio

Durante muitos anos o Se foi estudado devido a toxicidade causada em animais, onde seus efeitos tóxicos e os danos negativos causados por esse elemento, caracterizam o termo selenofobia. Não se sabe ainda ao certo como o Se pode desencadear as manifestações tóxicas, especula-se que compostos orgânicos e inorgânicos derivados deste elemento, ao interagirem com grupamentos tióis, que são mais reativos e facilmente oxidados, podem resultar nessa condição de toxicidade. O organoselênio Difenil disseleneto (DPDS) também age como um agente oxidante de grupamentos tióis, bem como interage com a enzima δ -aminolevulinate dehidratase inibindo-a (Rosa, Roesler *et al.* 2007, Nogueira and Rocha 2011).

O Selênio é um mineral essencial (Se), importante para várias funções

inerentes à saúde humana como a atividade de selenoproteínas, como a glutathione peroxidase e tioredoxina redutase, sendo a ingesta recomendada 55µg/dia para adultos (Dodig e Cepelak, 2004). A biossíntese destas proteínas é dependente da disponibilidade de Se, já que estas contêm o aminoácido selenocisteína (Sec) em seu sítio ativo. As selenoproteínas estão envolvidas nos mecanismos de defesa antioxidante e, sendo o cérebro um local propício para a geração de EROs devido à alta demanda de oxigênio para produção de energia, essas proteínas auxiliam na integridade das células neuronais e manutenção de suas funções (Papp, Lu *et al.* 2007).

As defesas antioxidantes oferecidas por essas enzimas protegem o cérebro de danos oxidativos que favorecem a vulnerabilidade de neurônios, quadro intimamente relacionado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. A importância do Se é tal que em condições de deficiência, a disponibilidade deste é priorizada a nível cerebral em relação a órgãos periféricos, sendo esse papel desempenhado pela Selenoproteína P (SeIP), que realiza o seu transporte no SNC (Pitts, Byrns *et al.* 2014).

Alguns estudos reportam a deficiência de Se como uma das condições que contribui para o déficit cognitivo (Akbaraly *et al.* 2007), já que as selenoproteínas são expressas a nível cerebral, como no hipocampo. A suplementação com selenito de sódio em ratos com dano neuronal induzido por estreptozotocina, melhorou a sinalização colinérgica através do aumento nos níveis de acetilcolina, um dos neurotransmissores mais prejudicados na DA (Ishrat *et al.* 2009). Além disso, há evidências de que o Se, através da suplementação de levedura enriquecida (levedura Se), atenua a formação do Aβ através da redução da atividade das enzimas β-secretase e γ-secretase e modula a autofagia (Gwon *et al.* 2010), (Song *et al.* 2018).

Durante várias décadas, o Se ganhou destaque pelo seu potencial tóxico e carcinogênico devido a sua interação com grupamentos tióis, promovendo a oxidação e geração de EROS. Entretanto, quando elucidado o seu papel como constituinte das selenoproteínas, houve aumento no interesse pela síntese de compostos orgânicos com potencial farmacológico. Atualmente, a síntese destes compostos é voltada aos efeitos antioxidantes, anticâncer, antitumorais, antimicrobianos, moduladores enzimáticos e hipoglicemiantes, por exemplo (Pietka-Ottlik, Wójtowicz-Młochowska *et al.* 2008, Plano, Baquedano *et al.* 2010, Barbosa,

Canto *et al.* 2016, Quines, Rosa *et al.* 2016, Gandin, Khalkar *et al.* 2018, Quines, Rosa *et al.* 2018, Spengler, Gajdács *et al.* 2019).

As propriedades farmacológicas destes compostos devem-se pela atividade do grupamento selenol que é análogo ao grupo tiol, sendo este metabolizado devido a reações fisiológicas envolvendo hidroperóxidos, através do consumo de glutathiona (GSH). Compostos orgânicos de Se, como o Ebselen, mimetizam a ação da GPx (Glutathiona Peroxidase) através do consumo de GSH para remover peroxinitritos (Figura 5).

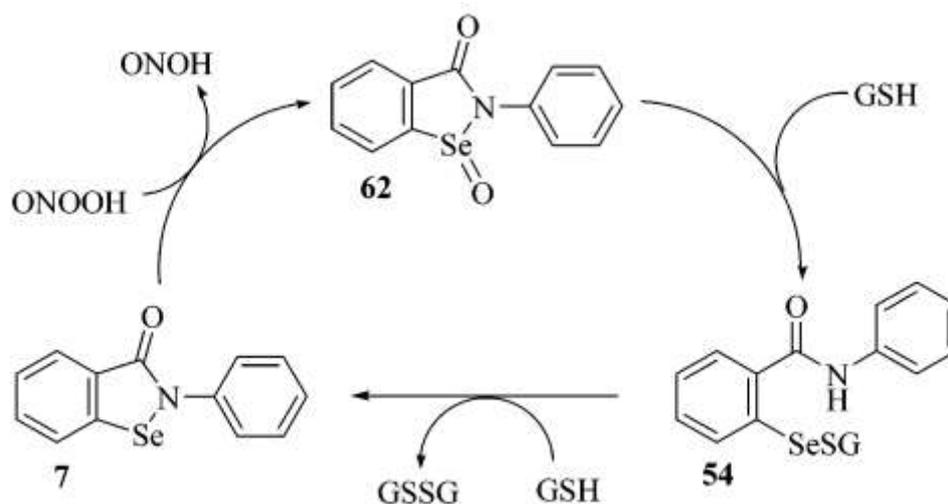


Figura 5: Mecanismos de ação do Ebselen na redução catalítica de peróxidos. Inicialmente ocorre a geração de selenóxido (62), oriundo do processo de redução de peróxido nitroso (ONOO^-) em nitrito. Posteriormente o selenóxido (62) é reduzido, através da GSH, formando o selenodisulfeto (54) e regenerando o ebselen novamente, utilizando equivalentes redutores na forma de GSH (Nogueira, Zeni *et al.* 2004).

Entre os compostos organoselenios, o Ebselen é o mais popular, por ter sido um dos primeiros a serem sintetizados (1940) e, portanto, um dos mais estudados. Suas propriedades terapêuticas foram somente elucidadas aproximadamente 40-50 anos após a sua síntese. Isso propiciou avanços na elucidação de seus efeitos terapêuticos, propiciando avanços em estudos clínicos que demonstraram sua eficácia. Tanto o Ebselen quando o outro composto de selênio também amplamente estudado, o disseleneto de difenila (DPDS), apresentam seus efeitos biológicos devido a essa capacidade de serem reduzidos a selenol além de mimetizar a atividade da GPx (Barbosa, Nogueira *et al.* 2017).

O Se como oligoelemento, bem como em formas orgânicas, apresenta propriedades que o tornam um candidato terapêutico para o DA. Destacam-se o potencial antioxidante e atividade inibitória de enzimas envolvidas na patogênese da

doença, bem como na prevenção da agregação das proteínas mal-formadas (Lindgren, Lindgren *et al.* 1985, Gamble, Wiseman *et al.* 1997, Song, Chen *et al.* 2018). De fato, alguns estudos com compostos organoselênio demonstraram efeitos terapêuticos em modelos para a DA. Em ratos com demência esporádica tipo DA, induzido com injeção intracerebroventricular de A β , o tratamento com Selenofuranosídeos demonstrou efeitos benéficos sobre aspectos cognitivos, protegendo contra a perda da memória, bem como a manutenção da atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e AChE, e redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 (interleucina-6) (Chiapinotto Spiazzi, Bucco Soares *et al.* 2015). Em um modelo de DA induzido por estreptozotocina, o p,p'-metoxil-disseleneto de difenila [(MeOPhSe)₂] reverteu os comprometimentos associados à aprendizagem e o aumento da atividade da AChE induzidos pela droga (Pinton, da Rocha *et al.* 2010).

Os efeitos na redução dos níveis do A β e fosforilação da proteína *tau* pelo Ebselen já foram demonstrados em modelos de estudo para a DA utilizando ratos e linhagens celulares. Este composto minimizou a disfunção cognitiva e o déficit sináptico, demonstrando seu efeito promissor no tratamento da DA (Xie, Tan *et al.* 2017). Além disso, este mesmo composto já demonstrou potencial inibitório sob o transportador divalente de metal 1 (DMT1) envolvido na homeostase do Fe, na deposição das placas amiloides e na fosforilação da *tau* (Xie, Zheng *et al.* 2012, Xie, Yu *et al.* 2018).

A classe das DHPMs compreende compostos heterocíclicos, sendo que uma das razões pela atividade biológica destas é a presença na sua estrutura da pirimidina, uma constituinte de bases timina, uracila e citosina, que estão presentes nos ácidos nucleicos (DNA e RNA) (Sondhi, Goyal *et al.* 2005). A síntese de organoselênios derivados de DHPMs, ocorre a partir da reação de Biginelli, que consiste na condensação de aldeídos aromáticos, etil-4-cloroacetato, ureia ou N-Me-uréia para originar 6-clorometil dihidropirimidinona, que subsequentemente, através da reação com selenocarboxilatos, promove a formação de Se-DHPMs. Esta recuperação é capaz de promover uma boa estabilidade (Barbosa, Canto *et al.* 2016).

Estes compostos da classe das dihidropirimidinonas (DHPMs), chamados selenoésteres, já demonstraram em estudos prévios *in vitro* potencial eficácia para o tratamento da DA, com atividade antioxidante, quelantes de metais e AChEi

(atividade superior ao fármaco padrão Galantamina) (Barbosa, Canto *et al.* 2016). Essas propriedades os tornam compostos de interesse para testes, quanto à segurança e eficácia, em organismos *in vivo* para o estudo da DA.

2.6 *Caenorhabditis elegans*

O *C.elegans* é um pequeno nematoide de vida livre, transparente, encontrado habitualmente no solo, em produtos oriundos da decomposição da matéria orgânica. Seu tamanho varia de 0.25mm (quando larvas, após a eclosão dos ovos) a 1mm (quando adultos). Por isso a observação destes vermes só é possível mediante o uso de estereomicroscópio (Hodgkin 2001).

Seu ciclo de vida é curto, de aproximadamente 3 dias desde ovo até o início do período reprodutivo, quando chegam a jovens adultos. Durante esse período o verme passa por 4 estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar ao estágio adulto. Entretanto, caso o *C.elegans* seja submetido a condições de estresse, devido à falta de alimento ou temperaturas não habituais a de manutenção (20°C no tipo selvagem), o mesmo entra em um estágio alternativo de resistência (*dauer*), que permite pela sobrevivência do animal por vários meses. Já o verme que persiste no ciclo habitual tem um tempo de vida estimado de 20 dias em média (Hall e Altun 2007).

Como o *C. elegans*, no ambiente, é encontrado na matéria orgânica, sua principal fonte de alimento são algumas bactérias que ali habitam. Em condições laboratoriais o verme é mantido em placas de ágar contendo NGM (Meio de Crescimento para Nematoides) semeado com a bactéria *Escherichia coli* (*E.coli*) como fonte de alimento (Stiernagle 1999) .

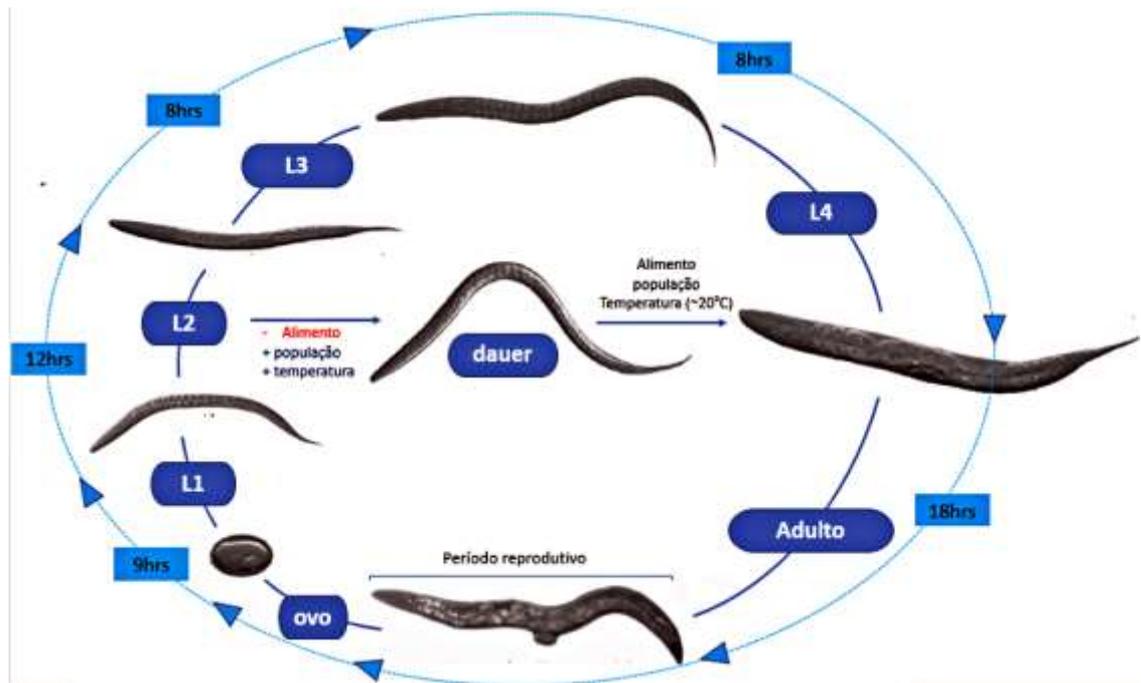


Figura 6. Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans*. Fonte: Autora.

Quando grande parte da população presente na placa de cultivo, encontrar-se no período reprodutivo (1º dia após L4), pode-se romper a cutícula dos vermes, através de um movimento mecânico juntamente a uma solução de lise (NaOH 1M, NaClO 1%, e H₂O destilada), para obtenção dos ovos e realização dos ensaios experimentais (Porta-de-la-Riva, Fontrodona *et al.* 2012).

O sistema nervoso deste nematóide é bastante complexo, apresentando 302 neurônios nos hermafroditas e 385 nos machos. Vinte destes neurônios estão localizados na faringe e os outros distribuídos ao longo de corpo do verme, como cabeça, músculo e cauda (Hobert 2005). A rede neuronal de *C. elegans* é conhecida desde 1986, bem como o conectoma. Este envolve as informações conectadas entre cerca de 90 neurônios sensoriais que recebem o estímulo e os transmitem por meio de 80 interneurônios, para 120 neurônios motores que controlam o comportamento locomotor do verme (Sabrin, Wei *et al.* 2019). Os neurônios são quem recebem essas informações sensoriais e as transmitem por meio da sinalização que se dá através de neurotransmissores acetilcolina, dopamina, tiramina, octopamina, ácido gama-aminobutírico e glutamato. Esse sistema de neurotransmissores é homólogo ao dos vertebrados, o que permite que efeitos e resultados no verme sejam extrapolados para outros sistemas mais complexos (Bargmann 1998).

Outra vantagem de se utilizar o *C. elegans* para ensaios laboratoriais é a alta

homologia de seu material genético com o de humanos. Cerca de 83% de seus genes são ortólogos aos dos humanos, isso inclui proteínas e vias envolvidas em vários processos metabólicos e de longevidade (Lai, Chou *et al.* 2000). Devido a isso, o genoma sequenciado e toda a linhagem celular da rede neuronal do verme já conhecida facilita a manipulação genética, visando a obtenção de cepas transgênicas. Vários tipos de cepas estão disponíveis e podem ser obtidas através do Centro Genético em *Caenorhabditis* (<https://cgc.umn.edu>). Entre estas cepas estão os modelos utilizados para o estudo de doenças neurodegenerativas, como a DA.

As cepas disponíveis apresentam expressão e agregação do peptídeo A β no corpo do verme (músculos) ou em neurônios, as quais podem apresentar alterações na quimiotaxia e disfunções locomotoras (paralisia). Estes fenótipos permitem a realização de alguns ensaios para avaliação dessas disfunções como quimiotaxia, locomoção, longevidade e postura de ovos. Além disso, a marcação *in vivo* destes agregados pode ser realizada utilizando corantes específicos, como o vermelho do congo e a tioflavina. Já a marcação com a proteína verde fluorescente (GFP) para o A β é restrita a neurônios glutamatérgicos (Link 2006, Alexander, Marfil *et al.* 2014, Griffin, Caldwell *et al.* 2017). Além disso, é possível realizar ensaios de alta eficiência em um menor tempo em relação a outros modelos animais. A disponibilidade de animais transgênicos possibilita que os mecanismos de ação destas novas drogas sejam elucidados.

Os compostos orgânicos de selênio tem sido testados quanto sua eficácia em cepas transgênicas para o estudo da DA, em *C.elegans*. O disseleneto de difenila atenuou a toxicidade induzida pela expressão do A β , revertendo os efeitos causados nos aspectos cognitivos relacionados a memória, em cepa transgênica para a DA (Zamberlan, Arantes *et al.* 2014). Já organoselenotriazóis atenuaram os efeitos causados pelo EO (estresse oxidativo), demonstrando a capacidade antioxidante em vermes que apresentam disfunção mitocondrial (Soares, Rodrigues *et al.* 2019). Da mesma forma, resultados demonstrando propriedades antioxidantes com redução de EROs após exposição ao paraquat, foram descritas após tratamento com 4-organilsulfenil-7-cloroquinolinas (Salgueiro, Xavier *et al.* 2014). β -selenoaminas e análogos de DPDS na concentração de 200 μ M, demonstraram ser potentes inibidores da AChEi em *C. elegans* (Stefanello, Gubert *et al.* 2015).

Atualmente, várias drogas tem sido testadas quanto a sua eficácia para a DA.

Sabe-se que entre as medicações comumente prescritas, a estreita margem terapêutica dificulta o seguimento ao tratamento, visto os efeitos adversos oriundos do aumento da dose efetiva para conter os sintomas da doença. Devido a isso, muitos pacientes acabam não aderindo à terapia. A maioria dos medicamentos disponíveis também apresentam uma limitação quanto a sua baixa abrangência multialvo. Novas drogas têm sido testadas, entretanto poucas acabam avançando para os ensaios clínicos com humanos, visto o empecilho entre dose terapêutica versus dose tóxica. A busca por novos compostos candidatos à terapia multialvo da DA tem sido constante. Selenoesteres já demonstraram efeitos promissores em ensaios *in vitro*, entretanto sua eficácia e segurança também necessitam ser elucidadas em um organismo *in vivo* que seja modelo para DA. Neste contexto, o *C.elegans* se mostra como um modelo promissor para triagem de compostos candidatos bem como elucidação de seus mecanismos de ação.

3. JUSTIFICATIVA

Levando em consideração i) a grande parcela de idosos presentes na população mundial e que anualmente é diagnosticada com a DA; ii) o fato de que essa doença não apresenta cura e nem um fármaco totalmente eficaz na contenção da progressão da doença e iii) a falta de abrangência terapêutica contra todos os sintomas e mecanismos fisiopatológicos da DA, é necessária a busca por novos compostos que possam apresentar ação multi-alvo na contenção da doença. Sendo assim, devido aos efeitos previamente descritos em estudos *in vitro* dos compostos de selenoesteres, torna-se imprescindível a continuação da avaliação da eficácia desses compostos em novos modelos experimentais para a DA *in vivo*, como o *C. elegans*, e, posteriormente, também em mamíferos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a potencial eficácia e segurança de selenoésteres em um modelo *in vivo* para o estudo da DA.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar a segurança dos compostos de selenoésteres em *C.elegans*;
- Avaliar os efeitos dos compostos de selenoésteres nas manifestações fenotípicas induzidas pela expressão do A β ;
- Avaliar os possíveis mecanismos de ação molecular destes compostos, via autofagia, chaperonas e sinalização colinérgica;
- Determinar a relação estrutura x atividade dos compostos.

5. MANUSCRITO

CONCLUSÕES

- Entre os 8 compostos selenoesteres testados, apenas o FA90 e FA86 na maior concentração (200 μ M) afetou a taxa de vermes vivos, apesar de não encontrarmos uma CL50;
- O composto FA90 foi capaz de exercer efeito protetor sobre as disfunções locomotoras associadas a agregação do A β (paralisia). Além de juntamente com o composto FA130 E fa86 aumentar a taxa de locomoção dos vermes tratados, 72 horas após a indução da expressão do A β ;
- O efeito promissor do FA90 na contenção das manifestações fenotípicas induzidas pela agregação do A β envolve a sinalização colinérgica e ativação de proteínas de choque térmico a nível reticular e mitocondrial;
- O anel fenil livre na extremidade do composto pode apresentar a capacidade de interagir com o anel indol Trp 279 no local ativo da AChE, explicando o efeito do selenoéster na redução da atividade da AChE.

PERSPECTIVAS

Considerando que as propriedades multialvo para o tratamento da DA com o composto FA90 foram demonstradas tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e seu efeito protetor age em um mecanismo molecular terapêutico ainda pouco explorado (via chaperonas). Para elucidar o real papel do Selênio na estrutura desse composto, poderíamos testar seu análogo, com um substituinte, verificando também um efeito crônico, após uma exposição mais prolongada com este tratamento. Bem como um tratamento de vermes adultos, após exposição a metais ou altas concentrações de glicose. Outros mecanismos fisiopatológicos associados a DA, também podem ser melhor explorados, como cepas transgênicas para a proteína *tau*.

Além disso, mais estudos avaliando outros mecanismos de sinalização, como o serotoninérgico, com o ensaio de postura de ovos através da utilização de serotonina podem ser realizados. O papel de enzimas antioxidantes, como Catalase e Superóxido dismutase são passíveis de avaliação *in vivo* com o selenoéster, bem como a geração de EROs. Aliado a isso avaliação de função mitocondrial, através da mensuração dos níveis de ATP.

Como não há cepas comercialmente disponíveis com os agregados de A β marcados com GFP, poderíamos utilizar uma cepa que mimetiza a agregação proteica, através do peptídeo degron (GFP::degron), que é expresso nos músculos e neurônios do verme, e seus depósitos ocasionam paralisia.

Ensaio visando avaliar a memória de curto e longo prazo podem ser realizados para verificar o comportamento do verme que expressa o A β , frente ao tratamento com o composto FA90. Além disso, mais estudos em modelos superiores, como camundongos, devem ser realizados visando verificar a reprodutibilidade destes resultados, bem como melhor explorar a avaliação de parâmetros cognitivos e de memória.

REFERÊNCIAS

- Akerfelt, M., R. I. Morimoto and L. Sistonen (2010). "Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan." Nature reviews. Molecular cell biology **11**(8): 545-555.
- Alberto, E. E., V. d. Nascimento and A. L. Braga (2010). "Catalytic application of selenium and tellurium compounds as glutathione peroxidase enzyme mimetics." Journal of the Brazilian Chemical Society **21**(11): 2032-2041.
- Alexander, A. G., V. Marfil and C. Li (2014). "Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases." Frontiers in genetics **5**: 279-279.
- Amadoruge, P. C. and K. J. Barnham (2011). "Alzheimer's disease and metals: a review of the involvement of cellular membrane receptors in metallosignalling." International journal of Alzheimer's disease **2011**: 542043-542043.
- Amenta, F. and S. K. Tayebati (2008). "Pathways of acetylcholine synthesis, transport and release as targets for treatment of adult-onset cognitive dysfunction." Curr Med Chem **15**(5): 488-498.
- Anand, K. S. and V. Dhikav (2012). "Hippocampus in health and disease: An overview." Annals of Indian Academy of Neurology **15**(4): 239-246.
- Andrade, S. and M. J. Ramalho (2019). "Natural Compounds for Alzheimer's Disease Therapy: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Studies." **20**(9).
- Arunkhamkaew, S., A. Athipornchai, N. Apiratikul, A. Suksamrarn and V. Ajavakom (2013). "Novel racemic tetrahydrocurcuminoid dihydropyrimidinone analogues as potent acetylcholinesterase inhibitors." Bioorganic & medicinal chemistry letters **23**(10): 2880-2882.
- Avila, D. S., A. Benedetto, C. Au, F. Manarin, K. Erikson, F. A. Soares, J. B. T. Rocha and M. Aschner (2012). "Organotellurium and organoselenium compounds attenuate Mn-induced toxicity in *Caenorhabditis elegans* by preventing oxidative stress." Free radical biology & medicine **52**(9): 1903-1910.
- Barbosa, F. A. R., R. F. S. Canto, S. Saba, J. Rafique and A. L. Braga (2016). "Synthesis and evaluation of dihydropyrimidinone-derived selenoesters as multi-targeted directed compounds against Alzheimer's disease." Bioorganic & Medicinal Chemistry **24**(22): 5762-5770.
- Barbosa, N. V., C. W. Nogueira, P. A. Nogara, F. Andreza, M. Aschner and J. B. Rocha (2017). "Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents." Metallomics **9**(12): 1703-1734.
- Barbosa, N., C. Nogueira, P. Nogara, A. de Bem, M. Aschner and J. B. Rocha (2017). "Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents." Metallomics **9**.
- Bargmann, C. I. (1998). "Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome." Science **282**(5396): 2028-2033.

- Bayer, T. A. and O. Wirths (2010). "Intracellular accumulation of amyloid-Beta - a predictor for synaptic dysfunction and neuron loss in Alzheimer's disease." Frontiers in aging neuroscience **2**: 8-8.
- Berendzen, K. M., J. Durieux, L.-W. Shao, Y. Tian, H.-E. Kim, S. Wolff, Y. Liu and A. Dillin (2016). "Neuroendocrine Coordination of Mitochondrial Stress Signaling and Proteostasis." Cell **166**(6): 1553-1563.e1510.
- Berk, C. and M. Sabbagh (2012). "Broader considerations of higher doses of donepezil in the treatment of mild, moderate, and severe Alzheimer's disease." International journal of Alzheimer's disease **2012**: 707468-707468.
- Bittar, A., N. Bhatt and R. Kayed (2020). "Advances and considerations in AD tau-targeted immunotherapy." Neurobiology of disease **134**: 104707-104707.
- Bitto, A., A. M. Wang, C. F. Bennett and M. Kaeberlein (2015). "Biochemical Genetic Pathways that Modulate Aging in Multiple Species." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **5**(11): a025114.
- Bonda, D. J., X. Wang, K. A. Gustaw-Rothenberg, G. Perry, M. A. Smith and X. Zhu (2009). "Mitochondrial Drugs for Alzheimer Disease." Pharmaceuticals (Basel, Switzerland) **2**(3): 287-298.
- Borah, B., P. Sacco and V. Zarotsky (2010). "Predictors of adherence among Alzheimer's disease patients receiving oral therapy." Curr Med Res Opin **26**(8): 1957-1965.
- Borah, B., P. Sacco and V. Zarotsky (2010). "Predictors of adherence among Alzheimer's disease patients receiving oral therapy." Current Medical Research and Opinion **26**(8): 1957-1965.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical biochemistry **72**: 248-254.
- Cai, H., W.-n. Cong, S. Ji, S. Rothman, S. Maudsley and B. Martin (2012). "Metabolic dysfunction in Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders." Current Alzheimer research **9**(1): 5-17.
- Callis, J. (2014). "The ubiquitination machinery of the ubiquitin system." The arabidopsis book **12**: e0174-e0174.
- Campanella, C., A. Pace, C. Caruso Bavisotto, P. Marzullo, A. Marino Gammazza, S. Buscemi and A. Palumbo Piccionello (2018). "Heat Shock Proteins in Alzheimer's Disease: Role and Targeting." International journal of molecular sciences **19**(9): 2603.
- Campbell, N. L., P. Dexter, A. J. Perkins, S. Gao, L. Li, T. C. Skaar, A. Frame, H. C. Hendrie, C. M. Callahan and M. A. Boustani (2013). "Medication adherence and tolerability of Alzheimer's disease medications: study protocol for a randomized controlled trial." Trials **14**: 125-125.
- Cerovic, M., G. Forloni and C. Balducci (2019). "Neuroinflammation and the Gut Microbiota: Possible Alternative Therapeutic Targets to Counteract Alzheimer's Disease?" Frontiers in aging neuroscience **11**: 284-284.
- Chen, G.-f., T.-h. Xu, Y. Yan, Y.-r. Zhou, Y. Jiang, K. Melcher and H. E. Xu (2017). "Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development." Acta

Pharmacologica Sinica **38**(9): 1205-1235.

Chen, P., M. R. Miah and M. Aschner (2016). "Metals and Neurodegeneration." F1000Research **5**: F1000 Faculty Rev-1366.

Chen, X.-Q. and W. C. Mobley (2019). "Exploring the Pathogenesis of Alzheimer Disease in Basal Forebrain Cholinergic Neurons: Converging Insights From Alternative Hypotheses." Frontiers in Neuroscience **13**(446).

Chen, Y., V. Scarcelli and R. Legouis (2017). "Approaches for Studying Autophagy in *Caenorhabditis elegans*." Cells **6**(3): 27.

Chiapinotto Spiazzi, C., M. Bucco Soares, A. Pinto Izaguirry, L. Musacchio Vargas, M. M. Zanchi, N. Frasson Pavin, R. Ferreira Affeldt, D. Seibert Ludtke, M. Prigol and F. W. Santos (2015). "Selenofuranoside Ameliorates Memory Loss in Alzheimer-Like Sporadic Dementia: AChE Activity, Oxidative Stress, and Inflammation Involvement." Oxid Med Cell Longev **2015**: 976908.

Chiapinotto Spiazzi, C., M. Bucco Soares, A. Pinto Izaguirry, L. Musacchio Vargas, M. M. Zanchi, N. Frasson Pavin, R. Ferreira Affeldt, D. Seibert Ludtke, M. Prigol and F. W. Santos (2015). "Selenofuranoside Ameliorates Memory Loss in Alzheimer-Like Sporadic Dementia: AChE Activity, Oxidative Stress, and Inflammation Involvement." Oxid Med Cell Longev **2015**: 976908.

Chong, F. P., K. Y. Ng, R. Y. Koh and S. M. Chye (2018). "Tau Proteins and Tauopathies in Alzheimer's Disease." Cell Mol Neurobiol **38**(5): 965-980.

Cole, S. L. and R. Vassar (2007). "The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1." Molecular neurodegeneration **2**: 22-22.

Collaborators, G. B. D. D. (2019). "Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." The Lancet. Neurology **18**(1): 88-106.

Colović, M. B., D. Z. Krstić, T. D. Lazarević-Pašti, A. M. Bondžić and V. M. Vasić (2013). "Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology." Current neuropharmacology **11**(3): 315-335.

Congdon, E. E. and E. M. Sigurdsson (2018). "Tau-targeting therapies for Alzheimer disease." Nature reviews. Neurology **14**(7): 399-415.

Corsi, A. K., B. Wightman and M. Chalfie (2015). "A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*." Genetics **200**(2): 387-407.

Crowe, E. P., F. Tuzer, B. D. Gregory, G. Donahue, S. J. Gosai, J. Cohen, Y. Y. Leung, E. Yetkin, R. Nativio, L. S. Wang, C. Sell, N. M. Bonini, S. L. Berger, F. B. Johnson and C. Torres (2016). "Changes in the Transcriptome of Human Astrocytes Accompanying Oxidative Stress-Induced Senescence." Front Aging Neurosci **8**: 208.

Cummings, J., G. Lee, A. Ritter and K. Zhong (2018). "Alzheimer's disease drug development pipeline: 2018." Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.) **4**: 195-214.

Cummings, J., G. Lee, A. Ritter, M. Sabbagh and K. Zhong (2019). "Alzheimer's disease drug development pipeline: 2019." Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions **5**: 272-293.

Cummings, J., G. Lee, A. Ritter, M. Sabbagh and K. Zhong (2019). "Alzheimer's

disease drug development pipeline: 2019." Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions **5**: 272-293.

Davies, P. and J. Koppel (2009). "Mechanism-based treatments for Alzheimer's disease." Dialogues in clinical neuroscience **11**(2): 159-169.

Dikic, I. (2017). "Proteasomal and Autophagic Degradation Systems." Annual review of biochemistry **86**: 193-224.

Dosanjh, L. E., M. K. Brown, G. Rao, C. D. Link and Y. Luo (2010). "Behavioral phenotyping of a transgenic *Caenorhabditis elegans* expressing neuronal amyloid-beta." J Alzheimers Dis **19**(2): 681-690.

Dvir, H., I. Silman, M. Harel, T. L. Rosenberry and J. L. Sussman (2010). "Acetylcholinesterase: from 3D structure to function." Chemico-biological interactions **187**(1-3): 10-22.

Evangelisti, E., R. Cascella, M. Becatti, G. Marrazza, C. M. Dobson, F. Chiti, M. Stefani and C. Cecchi (2016). "Binding affinity of amyloid oligomers to cellular membranes is a generic indicator of cellular dysfunction in protein misfolding diseases." Scientific Reports **6**(1): 32721.

Ewald, C. Y. and C. Li (2010). "Understanding the molecular basis of Alzheimer's disease using a *Caenorhabditis elegans* model system." Brain structure & function **214**(2-3): 263-283.

Fernandez, C. G., M. E. Hamby, M. L. McReynolds and W. J. Ray (2019). "The Role of APOE4 in Disrupting the Homeostatic Functions of Astrocytes and Microglia in Aging and Alzheimer's Disease." Frontiers in Aging Neuroscience **11**(14).

Ferreira-Vieira, T. H., I. M. Guimaraes, F. R. Silva and F. M. Ribeiro (2016). "Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System." Current neuropharmacology **14**(1): 101-115.

Florez-McClure, M. L., L. A. Hohsfield, G. Fonte, M. T. Bealor and C. D. Link (2007). "Decreased Insulin-Receptor Signaling Promotes the Autophagic Degradation of β -Amyloid Peptide in *C. elegans*." Autophagy **3**(6): 569-580.

Galimberti, D. and E. Scarpini (2016). "Old and new acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease." Expert Opin Investig Drugs **25**(10): 1181-1187.

Gamble, S. C., A. Wiseman and P. S. Goldfarb (1997). "Selenium-dependent glutathione peroxidase and other selenoproteins: Their synthesis and biochemical roles." Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology **68**(2): 123-134.

Gandin, V., P. Khalkar, J. Braude and A. P. Fernandes (2018). "Organic selenium compounds as potential chemotherapeutic agents for improved cancer treatment." Free Radical Biology and Medicine **127**: 80-97.

García-Ayllón, M.-S., I. Riba-Llena, C. Serra-Basante, J. Alom, R. Boopathy and J. Sáez-Valero (2010). "Altered levels of acetylcholinesterase in Alzheimer plasma." PLoS one **5**(1): e8701-e8701.

Giacobini, E. (2003). "Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease." Neurochem Res **28**(3-4): 515-522.

- Girard, L. R., T. J. Fiedler, T. W. Harris, F. Carvalho, I. Antoshechkin, M. Han, P. W. Sternberg, L. D. Stein and M. Chalfie (2007). "WormBook: the online review of *Caenorhabditis elegans* biology." Nucleic acids research **35**(Database issue): D472-D475.
- Glick, D., S. Barth and K. F. Macleod (2010). "Autophagy: cellular and molecular mechanisms." The Journal of pathology **221**(1): 3-12.
- Godyń, J., J. Jończyk, D. Panek and B. Malawska (2016). "Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials." Pharmacological reports : PR **68**(1): 127-138.
- Griffin, E. F., K. A. Caldwell and G. A. Caldwell (2017). "Genetic and Pharmacological Discovery for Alzheimer's Disease Using *Caenorhabditis elegans*." ACS chemical neuroscience **8**(12): 2596-2606.
- Grutzendler, J. and J. C. Morris (2001). "Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease." Drugs **61**(1): 41-52.
- Hale LA, Lee ES, Pantazis AK, Chronis N, Chalasani SH (2017) Altered Sensory Code Drives Juvenile-to-Adult Behavioral Maturation in *Caenorhabditis elegans*. eNeuro 3:ENEURO.0175-0116.2016.
- Hall, D. H. and Z. F. Altun (2007). C. elegans Atlas, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hempel, H., M. M. Mesulam, A. C. Cuello, M. R. Farlow, E. Giacobini, G. T. Grossberg, A. S. Khachaturian, A. Vergallo, E. Cavedo, P. J. Snyder and Z. S. Khachaturian (2018). "The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer's disease." Brain : a journal of neurology **141**(7): 1917-1933.
- Herrmann, N., C. Binder, W. Dalziel, S. Smyth and F. Camacho (2009). "Persistence with cholinesterase inhibitor therapy for dementia: an observational administrative health database study." Drugs Aging **26**(5): 403-407.
- Hirono, H., K. Watanabe, K. Hasegawa, K. Hiroyasu, K. Shibasaki and S. Ohkoshi (2018). "Anti-Dementia Drugs and Hepatotoxicity—Report of Two Cases." International Journal of Gerontology **12**(3): 261-263.
- Hobert, O. (2005). Specification of the nervous system. WormBook: The Online Review of C. elegans Biology [Internet], WormBook.
- Hodgkin, J. (2001). *Caenorhabditis Elegans*. Encyclopedia of Genetics. S. Brenner and J. H. Miller. New York, Academic Press: 251-256.
- Hölscher, C. (2019). "Insulin Signaling Impairment in the Brain as a Risk Factor in Alzheimer's Disease." Frontiers in Aging Neuroscience **11**(88).
- Huang, Y., X. Q. Liu, T. Wyss-Coray, W. J. Brecht, D. A. Sanan and R. W. Mahley (2001). "Apolipoprotein E fragments present in Alzheimer's disease brains induce neurofibrillary tangle-like intracellular inclusions in neurons." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(15): 8838-8843.
- Iqbal, K., F. Liu, C. X. Gong and I. Grundke-Iqbal (2010). "Tau in Alzheimer disease and related tauopathies." Current Alzheimer research **7**(8): 656-664.
- Ishrat, T., K. Parveen, M. M. Khan, G. Khuwaja, M. Khan, S. Yousuf, A. Ahmad, P. Shrivastava and F. Islam (2009). "Selenium prevents cognitive decline and oxidative

damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type." Brain research **1281**: 117-127.

Jann, M. W., K. L. Shirley and G. W. Small (2002). "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of cholinesterase inhibitors." Clin Pharmacokinet **41**(10): 719-739.

Jiang, C., G. Li, P. Huang, Z. Liu and B. Zhao (2017). "The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease." J Alzheimers Dis **58**(1): 1-15.

Jonides, J., R. L. Lewis, D. E. Nee, C. A. Lustig, M. G. Berman and K. S. Moore (2008). "The mind and brain of short-term memory." Annual review of psychology **59**: 193-224.

Kapulkin, V., B. G. Hiester and C. D. Link (2005). "Compensatory regulation among ER chaperones in *C. elegans*." FEBS Letters **579**(14): 3063-3068.

Kaushik, S. and A. M. Cuervo (2012). "Chaperones in autophagy." Pharmacological research **66**(6): 484-493.

Kaushik, S. and A. M. Cuervo (2018). "The coming of age of chaperone-mediated autophagy." Nature Reviews Molecular Cell Biology **19**(6): 365-381.

Kennedy, B. K., S. L. Berger, A. Brunet, J. Campisi, A. M. Cuervo, E. S. Epel, C. Franceschi, G. J. Lithgow, R. I. Morimoto, J. E. Pessin, T. A. Rando, A. Richardson, E. E. Schadt, T. Wyss-Coray and F. Sierra (2014). "Geroscience: Linking Aging to Chronic Disease." Cell **159**(4): 709-713.

Klaips, C. L., G. G. Jayaraj and F. U. Hartl (2018). "Pathways of cellular proteostasis in aging and disease." **217**(1): 51-63.

Koga, H., S. Kaushik and A. M. Cuervo (2011). "Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control." Ageing research reviews **10**(2): 205-215.

Kowalski, K. and A. Mulak (2019). "Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease." Journal of neurogastroenterology and motility **25**(1): 48-60.

Kowalski, K. and A. Mulak (2019). "Brain-Gut-Microbiota Axis in Alzheimer's Disease." Journal of neurogastroenterology and motility **25**(1): 48-60.

Lackie, R. E., A. Maciejewski, V. G. Ostapchenko, J. Marques-Lopes, W.-Y. Choy, M. L. Duennwald, V. F. Prado and M. A. M. Prado (2017). "The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases." Frontiers in Neuroscience **11**(254).

Lai, C. H., C. Y. Chou, L. Y. Ch'ang, C. S. Liu and W. Lin (2000). "Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics." Genome research **10**(5): 703-713.

Lanctôt, K. L., N. Herrmann and M. M. LouLou (2003). "Correlates of response to acetylcholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease." Journal of psychiatry & neuroscience : JPN **28**(1): 13-26.

Lindgren, B., G. Lindgren, E. Artursson and G. Puu (1985). "Acetylcholinesterase inhibition by sulphur and selenium heterosubstituted isomers of N,N-diethylcarbaryl choline and carbaryl." Journal of enzyme inhibition **1**(1): 1-11.

Link, C. D. (2006). "*C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: Lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease." Experimental Gerontology **41**(10): 1007-1013.

- Link, C. D., C. J. Johnson, V. Fonte, M.-C. Paupard, D. H. Hall, S. Styren, C. A. Mathis and W. E. Klunk (2001). "Visualization of fibrillar amyloid deposits in living, transgenic *Caenorhabditis elegans* animals using the sensitive amyloid dye, X-34." Neurobiology of Aging **22**(2): 217-226.
- Link, C., C. Johnson, V. Fonte, M.-C. Paupard, D. Hall, S. Styren, C. Mathis and W. Klunk (2001). "Visualization of fibrillar amyloid deposits in living, transgenic *Caenorhabditis elegans* animals using the sensitive amyloid dye, X-34." Neurobiology of aging **22**: 217-226.
- Liu, P.-P., Y. Xie, X.-Y. Meng and J.-S. Kang (2019). "History and progress of hypotheses and clinical trials for Alzheimer's disease." Signal transduction and targeted therapy **4**(1): 1-22.
- Lu, R.-C., M.-S. Tan, H. Wang, A.-M. Xie, J.-T. Yu and L. Tan (2014). "Heat shock protein 70 in Alzheimer's disease." BioMed research international **2014**: 435203-435203.
- Lublin, A. L. and C. D. Link (2013). "Alzheimer's disease drug discovery: in vivo screening using *Caenorhabditis elegans* as a model for β -amyloid peptide-induced toxicity." Drug discovery today. Technologies **10**(1): e115-e119.
- Luo, Y., B. Bolon, S. Kahn, B. D. Bennett, S. Babu-Khan, P. Denis, W. Fan, H. Kha, J. Zhang, Y. Gong, L. Martin, J. C. Louis, Q. Yan, W. G. Richards, M. Citron and R. Vassar (2001). "Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation." Nature neuroscience **4**(3): 231-232.
- Luo, Z., J. Sheng, Y. Sun, C. Lu, J. Yan, A. Liu, H.-b. Luo, L. Huang and X. Li (2013). "Synthesis and Evaluation of Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's Disease Based on the Fusion of Donepezil and Ebselen." Journal of Medicinal Chemistry **56**(22): 9089-9099.
- Maciejczyk, M., E. Żebrowska and A. Chabowski (2019). "Insulin Resistance and Oxidative Stress in the Brain: What's New?" International journal of molecular sciences **20**(4): 874.
- Marino Gammazza, A., C. C. Bavisotto, R. Barone, E. C. de Macario and A. J. Macario (2016). "Alzheimer's Disease and Molecular Chaperones: Current Knowledge and the Future of Chaperonotherapy." Curr Pharm Des **22**(26): 4040-4049.
- Martini, F., S. G. Rosa, I. P. Klann, B. C. W. Fulco, F. B. Carvalho, F. L. Rahmeier, M. C. Fernandes and C. W. Nogueira (2019). "A multifunctional compound ebselen reverses memory impairment, apoptosis and oxidative stress in a mouse model of sporadic Alzheimer's disease." J Psychiatr Res **109**: 107-117.
- Matioli, M. N. P. and R. Nitri (2015). "Mechanisms linking brain insulin resistance to Alzheimer's disease." Dementia & neuropsychologia **9**(2): 96-102.
- McColl, G., B. R. Roberts, T. L. Pukala, V. B. Kenche, C. M. Roberts, C. D. Link, T. M. Ryan, C. L. Masters, K. J. Barnham, A. I. Bush and R. A. Cherny (2012). "Utility of an improved model of amyloid-beta (A β (1)(-)(4)(2)) toxicity in *Caenorhabditis elegans* for drug screening for Alzheimer's disease." Mol Neurodegener **7**: 57.
- Melendez, A. and B. Levine (2009). "Autophagy in *C. elegans*." WormBook: 1-26.

Mimica, N. and P. Presecki (2009). "Side effects of approved antidementives." Psychiatria Danubina **21**: 108-113.

Mohammadi-Farani, A., A. Ahmadi, H. Nadri and A. Aliabadi (2013). "Synthesis, docking and acetylcholinesterase inhibitory assessment of 2-(2-(4-Benzylpiperazin-1-yl)ethyl)isoindoline-1,3-dione derivatives with potential anti-Alzheimer effects." DARU Journal of Pharmaceutical Sciences **21**(1): 47.

Molina, J., R. Rodriguez-Diaz, A. Fachado, M. C. Jacques-Silva, P.-O. Berggren and A. Caicedo (2014). "Control of insulin secretion by cholinergic signaling in the human pancreatic islet." Diabetes **63**(8): 2714-2726.

Moussa, C. E. H. (2017). "Beta-secretase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for Alzheimer's disease." Expert opinion on investigational drugs **26**(10): 1131-1136.

Namba, Y., M. Tomonaga, H. Kawasaki, E. Otomo and K. Ikeda (1991). "Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease." Brain research **541**(1): 163-166.

Nichols, E., C. E. I. Szoeki, S. E. Vollset, N. Abbasi, F. Abd-Allah, J. Abdela, M. T. E. Aichour, R. O. Akinyemi, F. Alahdab, S. W. Asgedom, A. Awasthi, S. L. Barker-Collo, B. T. Baune, Y. Béjot, A. B. Belachew, D. A. Bennett, B. Biadgo, A. Bijani, M. S. Bin Sayeed, C. Brayne, D. O. Carpenter, F. Carvalho, F. Catalá-López, E. Cerin, J.-Y. J. Choi, A. K. Dang, M. G. Degefa, S. Djalalinia, M. Dubey, E. E. Duken, D. Edvardsson, M. Endres, S. Eskandarieh, A. Faro, F. Farzadfar, S.-M. Fereshtehnejad, E. Fernandes, I. Filip, F. Fischer, A. K. Gebre, D. Geremew, M. Ghasemi-Kasman, E. V. Gnedovskaya, R. Gupta, V. Hachinski, T. B. Hagos, S. Hamidi, G. J. Hankey, J. M. Haro, S. I. Hay, S. S. N. Irvani, R. P. Jha, J. B. Jonas, R. Kalani, A. Karch, A. Kasaeian, Y. S. Khader, I. A. Khalil, E. A. Khan, T. Khanna, T. A. M. Khoja, J. Khubchandani, A. Kisa, K. Kissimova-Skarbek, M. Kivimäki, A. Koyanagi, K. J. Krohn, G. Logroscino, S. Lorkowski, M. Majdan, R. Malekzadeh, W. März, J. Massano, G. Mengistu, A. Meretoja, M. Mohammadi, M. Mohammadi-Khanaposhtani, A. H. Mokdad, S. Mondello, G. Moradi, G. Nagel, M. Naghavi, G. Naik, L. H. Nguyen, T. H. Nguyen, Y. L. Nirayo, M. R. Nixon, R. Ofori-Asenso, F. A. Ogbo, A. T. Olagunju, M. O. Owolabi, S. Panda-Jonas, V. M. d. A. Passos, D. M. Pereira, G. D. Pinilla-Monsalve, M. A. Piradov, C. D. Pond, H. Poustchi, M. Qorbani, A. Radfar, R. C. Reiner, Jr., S. R. Robinson, G. Roshandel, A. Rostami, T. C. Russ, P. S. Sachdev, H. Safari, S. Safiri, R. Sahathevan, Y. Salimi, M. Satpathy, M. Sawhney, M. Saylan, S. G. Sepanlou, A. Shafieesabet, M. A. Shaikh, M. A. Sahraian, M. Shigematsu, R. Shiri, I. Shiuie, J. P. Silva, M. Smith, S. Sobhani, D. J. Stein, R. Tabarés-Seisdedos, M. R. Tovani-Palone, B. X. Tran, T. T. Tran, A. T. Tsegay, I. Ullah, N. Venketasubramanian, V. Vlassov, Y.-P. Wang, J. Weiss, R. Westerman, T. Wijeratne, G. M. A. Wyper, Y. Yano, E. M. Yimer, N. Yonemoto, M. Yousefifard, Z. Zaidi, Z. Zare, T. Vos, V. L. Feigin and C. J. L. Murray (2019). "Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016." The Lancet Neurology **18**(1): 88-106.

Nogueira, C. W. and J. B. T. Rocha (2011). "Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds." Archives of Toxicology **85**(11): 1313-1359.

Nogueira, C. W., G. Zeni and J. B. T. Rocha (2004). "Organoselenium and

organotellurium compounds: toxicology and pharmacology." Chemical reviews **104**(12): 6255-6285.

Nyberg, L., M. Lövdén, K. Riklund, U. Lindenberger and L. Bäckman (2012). "Memory aging and brain maintenance." Trends in Cognitive Sciences **16**(5): 292-305.

O'Brien, R. J. and P. C. Wong (2011). "Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease." Annual review of neuroscience **34**: 185-204.

Orenstein, S. J. and A. M. Cuervo (2010). "Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance." Seminars in cell & developmental biology **21**(7): 719-726.

Papp, L. V., J. Lu, A. Holmgren and K. K. Khanna (2007). "From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health." Antioxidants & redox signaling **9**(7): 775-806.

Pietka-Ottlik, M., H. Wójtowicz-Młochowska, K. Kołodziejczyk, E. Piasecki and J. Młochowski (2008). "New Organoselenium Compounds Active against Pathogenic Bacteria, Fungi and Viruses." Chemical & pharmaceutical bulletin **56**: 1423-1427.

Piloni, N. E., V. Fernandez, L. A. Videla and S. Puntarulo (2013). "Acute iron overload and oxidative stress in brain." Toxicology **314**(1): 174-182.

Pinton, S., J. T. da Rocha, G. Zeni and C. W. Nogueira (2010). "Organoselenium improves memory decline in mice: Involvement of acetylcholinesterase activity." Neuroscience Letters **472**(1): 56-60.

Pitts, M. W., C. N. Byrns, A. N. Ogawa-Wong, P. Kremer and M. J. Berry (2014). "Selenoproteins in nervous system development and function." Biological trace element research **161**(3): 231-245.

Plano, D., Y. Baquedano, E. Ibáñez, I. Jiménez, J. A. Palop, J. E. Spallholz and C. Sanmartín (2010). "Antioxidant-prooxidant properties of a new organoselenium compound library." Molecules (Basel, Switzerland) **15**(10): 7292-7312.

Ponjoan, A., J. Garre-Olmo, J. Blanch, E. Fages, L. Alves-Cabratos, R. Marti-Lluch, M. Comas-Cufi, D. Parramon, M. Garcia-Gil and R. Ramos (2019). "Epidemiology of dementia: prevalence and incidence estimates using validated electronic health records from primary care." Clin Epidemiol **11**: 217-228.

Porta-de-la-Riva, M., L. Fontrodona, A. Villanueva and J. Cerón (2012). "Basic Caenorhabditis elegans methods: synchronization and observation." Journal of visualized experiments : JoVE(64): e4019-e4019.

Quines, C. B., S. G. Rosa, D. Velasquez, V. C. Prado, J. S. S. Neto and C. W. Nogueira (2018). "(p-ClPhSe)₂ stabilizes metabolic function in a rat model of neuroendocrine obesity induced by monosodium glutamate." Food Chem Toxicol **118**: 168-180.

Quines, C. B., S. G. Rosa, P. M. Chagas, J. T. da Rocha, F. Dobrachinski, N. R. Carvalho, F. A. Soares, S. C. da Luz and C. W. Nogueira (2016). "Homeostatic effect of p-chloro-diphenyl diselenide on glucose metabolism and mitochondrial function alterations induced by monosodium glutamate administration to rats." Amino Acids **48**(1): 137-148.

Radons, J. (2016). "The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?" Cell stress & chaperones **21**(3): 379-404.

Rand, J. B. (2007). "Acetylcholine." WormBook : the online review of C. elegans biology: 1-21.

Rand, J. B. (2007). "Acetylcholine." WormBook: 1-21.

Re, F., C. Airoidi, C. Zona, M. Masserini, B. La Ferla, N. Quattrocchi and F. Nicotra (2010). "Beta amyloid aggregation inhibitors: small molecules as candidate drugs for therapy of Alzheimer's disease." Current medicinal chemistry **17**(27): 2990-3006.

Richman, C., S. Rashid, S. Prashar, R. Mishra, P. R. Selvaganapathy and B. P. Gupta (2018). "C. elegans MANF Homolog Is Necessary for the Protection of Dopaminergic Neurons and ER Unfolded Protein Response." Frontiers in Neuroscience **12**(544).

Ridley, R. M., H. F. Baker and T. J. Crow (1986). "Transmissible and non-transmissible neurodegenerative disease: similarities in age of onset and genetics in relation to aetiology." Psychological medicine **16**(1): 199-207.

Rivera, I., R. Capone, D. M. Cauvi, N. Arispe and A. De Maio (2018). "Modulation of Alzheimer's amyloid β peptide oligomerization and toxicity by extracellular Hsp70." Cell stress & chaperones **23**(2): 269-279.

Sabrin, K. M., Y. Wei, M. van den Heuvel and C. Dovrolis (2019). "The hourglass organization of the *C. elegans* connectome." bioRxiv: 600999.

Salgueiro, W. G., M. C. D. F. Xavier, L. F. B. Duarte, D. F. Câmara, D. A. Fagundes, A. T. G. Soares, G. Perin, D. Alves and D. S. Avila (2014). "Direct synthesis of 4-organylsulfenyl-7-chloro quinolines and their toxicological and pharmacological activities in *Caenorhabditis elegans*." European journal of medicinal chemistry **75**: 448-459.

Scheffold, A., I. R. Holtman, S. Dieni, N. Brouwer, S.-F. Katz, B. M. C. Jebaraj, P. J. Kahle, B. Hengerer, A. Lechel, S. Stilgenbauer, E. W. G. M. Boddeke, B. J. L. Eggen, K.-L. Rudolph and K. Biber (2016). "Telomere shortening leads to an acceleration of synucleinopathy and impaired microglia response in a genetic mouse model." Acta neuropathologica communications **4**(1): 87-87.

Schilling, L. P., E. R. Zimmer, M. Shin, A. Leuzy, T. A. Pascoal, A. L. Benedet, W. V. Borelli, A. Palmi, S. Gauthier and P. Rosa-Neto (2016). "Imaging Alzheimer's disease pathophysiology with PET." Dementia & neuropsychologia **10**(2): 79-90.

Sengupta, P. and A. D. T. Samuel (2009). "Caenorhabditis elegans: a model system for systems neuroscience." Current opinion in neurobiology **19**(6): 637-643.

Sharma, K. (2019). "Cholinesterase inhibitors as Alzheimer's therapeutics (Review)." Molecular medicine reports **20**(2): 1479-1487.

Shin, C. Y., H.-S. Kim, K.-H. Cha, D. H. Won, J.-Y. Lee, S. W. Jang and U. D. Sohn (2018). "The Effects of Donepezil, an Acetylcholinesterase Inhibitor, on Impaired Learning and Memory in Rodents." Biomolecules & therapeutics **26**(3): 274-281.

Silva, D. C. G. d., W. Segheto, F. A. Coelho, V. G. Reis, S. H. O. Morais, M. C. Pessoa and G. Z. Longo (2017). "Risk and protective factors for chronic diseases in adults: a population-based study." Ciencia & saude coletiva **22**: 4041-4050.

- Soares, A. T. G., L. B. L. Rodrigues, W. G. Salgueiro, A. H. d. C. Dal Forno, C. F. Rodrigues, M. Sacramento, J. Franco, D. Alves, R. d. P. Oliveira, S. Pinton and D. S. Ávila (2019). "Organoselenotriazoles attenuate oxidative damage induced by mitochondrial dysfunction in mev-1 *Caenorhabditis elegans* mutants." Journal of Trace Elements in Medicine and Biology **53**: 34-40.
- Solovyev, N., E. Drobyshev, G. Bjørklund, Y. Dubrovskii, R. Lysiuk and M. P. Rayman (2018). "Selenium, selenoprotein P, and Alzheimer's disease: is there a link?" Free Radical Biology and Medicine **127**: 124-133.
- Sondhi, S. M., R. N. Goyal, A. M. Lahoti, N. Singh, R. Shukla and R. Raghbir (2005). "Synthesis and biological evaluation of 2-thiopyrimidine derivatives." Bioorganic & Medicinal Chemistry **13**(9): 3185-3195.
- Song, G. L., C. Chen, Q. Y. Wu, Z. H. Zhang, R. Zheng, Y. Chen, S. Z. Jia and J. Z. Ni (2018). "Selenium-enriched yeast inhibited beta-amyloid production and modulated autophagy in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease." Metallomics **10**(8): 1107-1115.
- Sorrentino, V., M. Romani, L. Mouchiroud, J. S. Beck, H. Zhang, D. D'Amico, N. Moullan, F. Potenza, A. W. Schmid, S. Rietsch, S. E. Counts and J. Auwerx (2017). "Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid- β proteotoxicity." Nature **552**(7684): 187-193.
- Spengler, G., M. Gajdács, M. A. Marć, E. Domínguez-Álvarez and C. Sanmartín (2019). "Organoselenium Compounds as Novel Adjuvants of Chemotherapy Drugs-A Promising Approach to Fight Cancer Drug Resistance." Molecules (Basel, Switzerland) **24**(2): 336.
- Spinelli, M., S. Fusco and C. Grassi (2019). "Brain Insulin Resistance and Hippocampal Plasticity: Mechanisms and Biomarkers of Cognitive Decline." Frontiers in neuroscience **13**: 788-788.
- Stefanello, S. T., P. Gubert, B. Puntel, C. R. Mizdal, M. M. A. d. Campos, S. M. Salman, L. Dornelles, D. S. Avila, M. Aschner and F. A. A. Soares (2015). "Protective effects of novel organic selenium compounds against oxidative stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Toxicology Reports **2**: 961-967.
- Stiernagle, T. (1999). "Maintenance of *C. elegans*." C. elegans **2**: 51-67.
- Styren, Scot D., R. L. Hamilton, G. C. Styren and W. E. Klunk (2000). "X-34, A Fluorescent Derivative of Congo Red: A Novel Histochemical Stain for Alzheimer's Disease Pathology." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **48**(9): 1223-1232.
- Takahashi, R. H., T. Nagao and G. K. Gouras (2017). "Plaque formation and the intraneuronal accumulation of beta-amyloid in Alzheimer's disease." Pathol Int **67**(4): 185-193.
- Tayeb, H. O., H. D. Yang, B. H. Price and F. I. Tarazi (2012). "Pharmacotherapies for Alzheimer's disease: Beyond cholinesterase inhibitors." Pharmacology & Therapeutics **134**(1): 8-25.
- Triaca, V. and P. Calissano (2016). "Impairment of the nerve growth factor pathway driving amyloid accumulation in cholinergic neurons: the incipit of the Alzheimer's disease story?" Neural Regeneration Research **11**(10): 1553-1556.

- Trojsi, F., F. Christidi, R. Migliaccio, H. Santamaría-García and G. Santangelo (2018). "Behavioural and Cognitive Changes in Neurodegenerative Diseases and Brain Injury." Behavioural neurology **2018**: 4935915-4935915.
- Trunova, S. and E. Giniger (2012). "Absence of the Cdk5 activator p35 causes adult-onset neurodegeneration in the central brain of *Drosophila*." Disease models & mechanisms **5**(2): 210-219.
- Tung, Y. T., W. M. Hsu, B. J. Wang, S. Y. Wu, C. T. Yen, M. K. Hu and Y. F. Liao (2008). "Sodium selenite inhibits gamma-secretase activity through activation of ERK." Neurosci Lett **440**(1): 38-43.
- van Marum, R. J. (2009). "Update on the use of memantine in Alzheimer's disease." Neuropsychiatric disease and treatment **5**: 237-247.
- Verdile, G., K. N. Keane, V. F. Cruzat, S. Medic, M. Sabale, J. Rowles, N. Wijesekara, R. N. Martins, P. E. Fraser and P. Newsholme (2015). "Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease." Mediators of inflammation **2015**: 105828-105828.
- Vogt, N. M., R. L. Kerby, K. A. Dill-McFarland, S. J. Harding, A. P. Merluzzi, S. C. Johnson, C. M. Carlsson, S. Asthana, H. Zetterberg, K. Blennow, B. B. Bendlin and F. E. Rey (2017). "Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease." Scientific Reports **7**(1): 13537.
- Wang, J. and G.-J. Chen (2016). "Mitochondria as a therapeutic target in Alzheimer's disease." Genes & Diseases **3**(3): 220-227.
- Wang, Y., Z. Wang, Y. Wang, F. Li, J. Jia, X. Song, S. Qin, R. Wang, F. Jin, K. Kitazato and Y. Wang (2018). "The Gut-Microglia Connection: Implications for Central Nervous System Diseases." Frontiers in Immunology **9**(2325).
- Watkins, P. B., H. J. Zimmerman, M. J. Knapp, S. I. Gracon and K. W. Lewis (1994). "Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with Alzheimer's disease." Jama **271**(13): 992-998.
- Wattmo, C. and Å. K. Wallin (2017). "Early- versus Late-Onset Alzheimer Disease: Long-Term Functional Outcomes, Nursing Home Placement, and Risk Factors for Rate of Progression." Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra **7**(1): 172-187.
- Wilcock, D. M., A. Rojiani, A. Rosenthal, S. Subbarao, M. J. Freeman, M. N. Gordon and D. Morgan (2004). "Passive immunotherapy against Abeta in aged APP-transgenic mice reverses cognitive deficits and depletes parenchymal amyloid deposits in spite of increased vascular amyloid and microhemorrhage." Journal of neuroinflammation **1**(1): 24-24.
- Willenborg, B., A. Schmoller, J. Caspary, U. H. Melchert, H. G. Scholand-Engler, K. Jauch-Chara, F. Hohagen, U. Schweiger and K. M. Oltmanns (2011). "Memantine Prevents Hypoglycemia-Induced Decrements of the Cerebral Energy Status in Healthy Subjects." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **96**(2): E384-E388.
- Wollenhaupt, S. G., A. T. Soares, W. G. Salgueiro, S. Noremborg, G. Reis, C. Viana, P. Gubert, F. A. Soares, R. F. Affeldt, D. S. Ludtke, F. W. Santos, C. C. Denardin, M. Aschner and D. S. Avila (2014). "Seleno- and telluro-xylofuranosides attenuate Mn-

induced toxicity in *C. elegans* via the DAF-16/FOXO pathway." Food Chem Toxicol **64**: 192-199.

Xie, L., D. Yu, J. Hu, Y. Fang, Z. Zuo, Y. Gu and D. Li (2018). "DMT1 inhibitor ebselen inhibits iron-induced amyloidogenic APP processing." Int J Clin Exp Med **11**(8): 7907-7916.

Xie, L., W. Zheng, N. Xin, J.-W. Xie, T. Wang and Z.-Y. Wang (2012). "Ebselen inhibits iron-induced tau phosphorylation by attenuating DMT1 up-regulation and cellular iron uptake." Neurochemistry International **61**(3): 334-340.

Yamazaki, Y., N. Zhao, T. R. Caulfield, C.-C. Liu and G. Bu (2019). "Apolipoprotein E and Alzheimer disease: pathobiology and targeting strategies." Nature Reviews Neurology **15**(9): 501-518.

Yim, S. H., C. B. Clish and V. N. Gladyshev (2019). "Selenium Deficiency Is Associated with Pro-longevity Mechanisms." Cell Rep **27**(9): 2785-2797.e2783.

Zamberlan, D. C., L. P. Arantes, M. L. Machado, R. Golombieski and F. A. Soares (2014). "Diphenyl-diselenide suppresses amyloid-beta peptide in *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease." Neuroscience **278**: 40-50.

Nogueira, C. W. and J. B. T. Rocha (2011). "Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds." Archives of Toxicology **85**(11): 1313-1359.

Rosa, R. M., R. Roesler, A. Braga, J. Saffi and J. Henriques (2007). "Pharmacology and toxicology of diphenyl diselenide in several biological models." Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.] **40**: 1287-1304.

Soares, A. T. G., L. B. L. Rodrigues, W. G. Salgueiro, A. H. d. C. Dal Forno, C. F. Rodrigues, M. Sacramento, J. Franco, D. Alves, R. d. P. Oliveira, S. Pinton and D. S. Ávila (2019). "Organoselenotriazoles attenuate oxidative damage induced by mitochondrial dysfunction in mev-1 *Caenorhabditis elegans* mutants." Journal of Trace Elements in Medicine and Biology **53**: 34-40.

Stefanello, S., P. Gubert, B. Puntel, C. Mizdal, M. Campos, S. Salman, L. Dornelles, D. Avila, M. Aschner and F. Soares (2015). "Protective effects of novel organic selenium compounds against oxidative stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*." Toxicology Reports **2**: 961-967.

Xin, L., R. Yamujala, Y. Wang, H. Wang, W.-H. Wu, M. A. Lawton, C. Long and R. Di (2013). "Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Lycoris radiata* delay paralysis of amyloid beta-expressing transgenic *C. elegans* CL4176." PloS one **8**(5): e63874-e63874.

