

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



TESE

**UMA QUINOLINA CONTENDO SELÊNIO ATENUA O DÉFICIT COGNITIVO:
ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA NEUROPLASTICIDADE EM
RATOS ENVELHECIDOS**

ANELISE BARTH

PELOTAS, 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO

Anelise Barth

**UMA QUINOLINA CONTENDO SELÊNIO ATENUA O DÉFICIT COGNITIVO:
ENVOLVIMENTO DO ESTRESSE OXIDATIVO E DA NEUROPLASTICIDADE EM
RATOS ENVELHECIDOS**

Tese apresentada por **Anelise Barth** como
pré-requisito para obtenção do GRAU DE
DOUTORA em Bioquímica e Bioprospecção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Luchese
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm

PELOTAS, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B284q Barth, Anelise

Uma quinolina contendo selênio atenua o déficit cognitivo : envolvimento do estresse oxidativo e da neuroplasticidade em ratos envelhecidos / Anelise Barth ; Cristiane Luchese, orientador ; Ethel Antunes Wilhelm , coorientador. — Pelotas, 2019.

138 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Selênio. 2. Quinolina. 3. Memória. 4. Estresse oxidativo. 5. Envelhecimento. I. Luchese, Cristiane, orient. II. , Ethel Antunes Wilhelm, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO

Anelise Barth

Uma quinolina contendo selênio atenua o déficit cognitivo: envolvimento do estresse oxidativo e da neuroplasticidade em ratos envelhecidos

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutora em Bioquímica e Bioprospecção, Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, avaliada pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Cristiane Luchese - Orientadora
Universidade Federal de Pelotas



Prof. Dr. César Augusto Brüning
Universidade Federal de Pelotas



Prof^a. Dr^a. Ana Paula Pesarico
Universidade Federal de Pelotas



Prof^a. Dr^a. Marina Prigol
Universidade Federal do Pampa



Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dr. Cristiane Luchese e co-orientação da Prof^a. Dr. Ethel Antunes Wilhelm no Laboratório de Pesquisa em Farmacologia Bioquímica do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas. A pesquisa foi financiada pelos projetos aprovados na FAPERGS e no CNPq.

Agradecimentos aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPERGS para o desenvolvimento deste trabalho; aos Laboratórios de Farmacologia Bioquímica (LAFARBIO), Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL) da Faculdade de Química (UFPEL) e Laboratório de Genômica Estrutural da Faculdade de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas – RS, (UFPEL), necessários para a realização dos experimentos práticos e para a elaboração da presente tese.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela saúde e por permitir que eu tenha pessoas maravilhosas ao meu redor.

As minhas orientadoras Cristiane Luchese e Ethel Antunes Wilhelm, pela confiança depositada em mim. Por sempre ter acreditado no meu potencial e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa.

À família, por todo o apoio, amor e carinho. Aos meus pais, Ana Iris e Anselmo, pela minha vida e pelas oportunidades que sempre me proporcionaram. Ao meu irmão André Henrique pelo companheirismo e amizade. Obrigada por todo o amor e cuidado que sempre dedicou a mim.

Ao meu namorado, melhor amigo, Gleison, pelo amor, amizade e companheirismo. Obrigada por fazer parte de mais uma etapa importante da minha vida.

Aos meus amigos. Obrigada por todos os sorrisos e bons momentos compartilhados. Em especial, às minhas amigas de infância, de cursinho pré-vestibular, àqueles que conquistei na Faculdade de Farmácia da UFSM, durante o mestrado na UFRGS e ao Laboratório de Análises Clínicas da UFPEL. Saibam que minha vida não teria o mesmo valor sem a presença de vocês. Vocês estarão comigo por toda minha vida.

A todos os amigos e colegas do grupo LAFARBIO. Obrigada pelos momentos de descontração e também de muito trabalho.

Aos Professores Marina Prigol, César Brüning e Ana Paula Pesarico por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese.

Resumo

O selênio é um oligoelemento que desempenha um importante papel em muitos processos biológicos e estados de doença. Nesse sentido, os compostos orgânicos de selênio atraem a atenção da comunidade científica, devido as suas atividades farmacológicas. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o possível efeito do composto 7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina (4-PSQ) em atenuar a disfunção cognitiva e o envolvimento do estresse oxidativo e da neuroplasticidade em ratos envelhecidos. Foram utilizados ratos Wistar, os quais foram divididos em 3 grupos: grupo I (ratos jovens – 3 meses de idade, 1 ml/Kg de óleo de canola), grupo II (ratos velhos – 22 meses de idade, 1 mL/kg de óleo de canola), grupo III (ratos velhos + 5 mg/kg de 4-PSQ). Após 7 dias de tratamento, os animais foram testados nas tarefas comportamentais. No 7º dia, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto. No 8º dia, os animais foram submetidos ao teste do reconhecimento do objeto para avaliar a memória de curto (MCP) e de longo prazo (MLP). Por fim, no 14º dia foram submetidos à eutanásia para os experimentos *ex vivo*. As dosagens bioquímicas *ex vivo* propostas nos hipocampus, córtex cerebrais e sangue tem por finalidade investigar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito do composto na melhora da memória dos ratos velhos. Foram realizadas a expressão das moléculas de adesão neuronal (NCAM e PST) e atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) nas estruturas cerebrais, bem como os níveis de colesterol sérico. Além disso, a fim de determinar o potencial antioxidante do composto nos tecidos dos ratos velhos, foram determinadas em fígado, rim, córtex cerebral e baço os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e tióis não proteicos (NPSH), bem como a atividade das enzimas catalase (CAT), glutatona S-transferase (GST), e δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA-D). Além do mais, foram dosados os níveis séricos de ureia e creatinina, bem como a atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), assim como foram dosados os níveis selênio. Os resultados demonstraram que o tratamento de ratos idosos com 4-PSQ foi capaz de restaurar a memória espacial de longo e curto prazo nos testes de reconhecimento do objetos. No teste do campo aberto, a redução na atividade exploratória (número de levantamentos) causado pelo envelhecimento não foi alterada pelo 4-PSQ, mas o composto restaurou parcialmente a atividade locomotora (número de cruzamentos). O 4-PSQ modulou a expressão de NCAM e PST e a atividade da AChE nas estruturas cerebrais, bem como o aumento nos níveis de colesterol plasmático, causado pelo envelhecimento dos animais. Além disso, foi possível verificar que o composto restaurou o dano oxidativo no fígado, rim, baço e córtex cerebral (como demonstrado pela restauração do TBARS, NPSH, CAT e GST) e a injúria tecidual (como demonstrado pela restauração da ureia, creatinina, AST e ALT) dos ratos. Adicionalmente, os níveis de selênio plasmático aumentaram após o tratamento com o 4-PSQ. Em conclusão, o 4-PSQ foi capaz de restaurar o comprometimento cognitivo e o dano oxidativo causado pelo envelhecimento em ratos. Importante destacar que o composto modulou a plasticidade sináptica, o sistema colinérgico e os níveis de colesterol. Além disso, o composto apresenta potencial antioxidante contra danos oxidativos nos tecidos causado pelo envelhecimento.

Palavras-Chave: selênio, quinolina, memória, estresse oxidativo, envelhecimento.

Abstract

Selenium is a trace element that plays an important role in many biological processes and disease states. In this sense, organic selenium compounds attract the attention of the scientific community due to their pharmacological activities. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on even a cognitive dysfunction and the involvement of oxidative stress and neuroplasticity in aged rats. Wistar rats were used and divided into 3 groups: group I (young rats - 3 months old, 1 ml / kg canola oil), group II (old rats - 22 months old, 1 ml / kg canola oil), group III (old rats + 5 mg / kg 4-PSQ). After 7 days of treatment, the animals were tested for behavioral tasks. On day 7, the animals underwent the open field test. On day 8, the animals underwent the object recognition test to assess short (STM) and long-term (LTM) memory. Finally, on day 14, they were euthanized for ex vivo experiments. The proposed ex vivo biochemical dosages in the hippocampus, cerebral cortex and blood aim to investigate the possible mechanisms involved in the effect of the compound on memory improvement of old rats. The expression of neuronal adhesion molecules (NCAM and PST) and acetylcholinesterase enzyme (AChE) activity were performed in brain structures, as well as serum cholesterol levels. Furthermore, in order to determine the antioxidant potential of the compound in the tissues of old rats, levels of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and non-protein thiols (NPSH) were determined in liver, kidney, cerebral cortex and spleen, as well as catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), and δ -aminolevulinic acid dehydratase (δ -ALA-D) activity. In addition, serum urea and creatinine levels were measured, as well as serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activity, as well as selenium levels. The results showed that treatment of aged 4-PSQ rats was able to restore long and short term spatial memory in object recognition tests. In the open field test, the reduction in exploratory activity (number of surveys) caused by aging was not altered by 4-PSQ, but the compound partially restored locomotor activity (number of crossings). 4-PSQ modulate NCAM and PST expression and AChE activity in brain structures, as well as the increase in plasma cholesterol levels caused by aging. In addition, it was found that the compound restored oxidative damage to the liver, kidney, spleen, and cerebral cortex (as demonstrated by restoration of TBARS, NPSH, CAT, and GST) and tissue injury (as demonstrated by restoration of urea, creatinine, AST and ALT) of rats. Additionally, plasma selenium levels increased after treatment with 4-PSQ. In conclusion, 4-PSQ was able to restore cognitive impairment and oxidative damage caused by aging in rats. Importantly, the compound modulated synaptic plasticity, cholinergic system and cholesterol levels. In addition, the compound has antioxidant potential against oxidative tissue damage caused by aging.

Key words: selenium, quinoline, memory, oxidative stress, aging.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Representação de uma sinapse da via colinérgica.

Figura 2. Estrutura química do Ebselen.

Figura 3. Estrutura química do disseleneto de difenila (PhSe)₂

Figura 4. Estrutura química do p-cloro-difenil disseleneto.

Figura 5. Estrutura química do (Z)-2,3-bis(4-clorofenilselanil).

Figura 6. Estrutura química do p,p'-metoxildifenil diseleneto (MeOPhSe)₂

Figura 7. Estrutura química da quinolina.

Figura 8. Estrutura química do 7-cloro-4-(fenilselanil)quinolina (4-PSQ).

ARTIGO 1

Fig. 1 Chemical structure of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ)

Fig. 2 The experimental protocol. Aged rats were intragastrically (i.g.) treated for seven days with 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) (5 mg/kg) or vehicle (canola oil) (1 ml/kg). Young adult animals received the vehicle. Open field test (OFT), object recognition test (ORT) were performed on the 7th, 8th and 9th days, respectively. On the 14th day the animals were euthanized by inhalation of isoflurane for *ex vivo* assays

Fig. 3 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) treatment (5 mg/kg, intragastrically (i.g.), for 7 days) on a exploratory (A) and locomotor (B) behavior of rats in the open field test (OFT). OFT was conducted on the 7th day. Values are expressed as mean ± standard error of the mean (S.E.M.) (n = 10 rats/ group). (**)

denotes $p < 0.01$, (***) denotes $p < 0.001$, (****) denotes $p < 0.0001$ as compared to the young adult group. (#) denotes $p < 0.05$, (##) denotes $p < 0.01$, (####) denotes $p < 0.0001$ as compared to the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

Fig. 4 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) treatment (5 mg/kg, intragastrically (i.g.), for 7 days) on a short-term (A) and long-term (B) memories in the object recognition test (ORT). ORT was conducted on the 8th and 9th days. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) ($n = 10$ rats/group). (**) denotes $p < 0.01$, (***) denotes $p < 0.001$, (****) denotes $p < 0.0001$ as compared to the young adult group. (##) denotes $p < 0.01$, (###) denotes $p < 0.001$, (####) denotes $p < 0.0001$ as compared to the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

Fig. 5 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) treatment (5 mg/kg, intragastrically (i.g.), for 7 days) on the acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B) of rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) ($n = 10$ rats/group). (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the young adult group. (#) denotes $p < 0.05$, (##) denotes $p < 0.01$ as compared to the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

Fig. 6 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) treatment (5 mg/kg, intragastrically (i.g.), for 7 days) on the neural cell adhesion molecule (NCAM) levels in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B) of rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) ($n = 7$ rats/group). (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the young adult group. (#) denotes $p < 0.05$, (###) denotes $p < 0.001$ as compared to the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

Fig. 7 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) treatment (5 mg/kg, intragastrically (i.g.), for 7 days) on the polysialyltransferase PST levels in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B) of rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) ($n = 7$ rats/group). (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the young adult group. (#) denotes $p < 0.05$, (###) denotes $p < 0.001$ as compared to the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

Fig. 8 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) treatment (5 mg/kg, intragastrically (i.g.), for 7 days) on the polysialyltransferase STX levels in the cerebral cortex (A) and hippocampus (B) of rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) (n = 7 rats/ group). (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the young adult group. (##) denotes $p < 0.01$ as compared to the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

Fig. 9 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) treatment (5 mg/kg, intragastrically (i.g.), for 7 days) on the plasmatic cholesterol levels of rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) (n = 7 rats/ group). (**) denotes $p < 0.01$ as compared to the young adult group. (#) denotes $p < 0.05$, (##) denotes $p < 0.01$ as compared to the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

MANUSCRITO 1

Fig. 1 Chemical structure of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ)

Fig. 2 The experimental protocol. Aged rats were intragastrically (i.g.) treated for seven days with 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) (5 mg/kg) or vehicle (canola oil) (1 ml/kg). Young adults animals received the vehicle. On the 14th day, animals were euthanized by inhalation of isoflurane for *ex vivo* assays.

Fig. 3 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) in the Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) levels in liver (A), kidney (B) spleen (C) and cerebral cortex (D). Data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). (***) denotes $p < 0.001$ as compared to the young adults group. (##) denotes $p < 0.01$ and (###) denotes $p < 0.001$ as compared to the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test). MDA means malondialdehyde.

Fig. 4 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) in the δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activity in liver (A), kidney (B) spleen (C) and cerebral cortex (D). Data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of ten animals per group. (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the young adults group (***)

denotes $p < 0.001$ as compared to the young adults group. (#) denotes $p < 0.01$ as compared to the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test).

Fig. 5 Effect of 7-chloro-4-(phenylselenanyl) quinoline (4-PSQ) in the elemental selenium in plasma. Data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of four animals per group. (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the young adults group. (###) denotes $p < 0.001$ as compared to the aged group. (Student's *t*-test (confidence level of 95%, $p > 0.05$)).

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Table 1. Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) in the GST activity in liver, kidney, spleen and cerebral cortex of aged rats.

Table 2. Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) in the CAT activity in liver, kidney, spleen and cerebral cortex of aged rats.

Table 3. Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) in the NPSH levels in liver, kidney, spleen and cerebral cortex of aged rats.

Table 4. Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) in the hepatic and renal markers in plasma of aged rats.

LISTA DE ABREVIATURAS

4-PSQ - 7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina
ACh - Acetilcolina
AChE - Acetilcolinesterase
ALT - Alanina Aminotransferase
AST - Aspartato Aminotransferase
CAT - Catalase
ChAT - Colina Acetiltransferase
DNA - Ácido Desoxirribunucleico
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
ERs - Espécies Reativas
FNIII - Fibronectina de tipo III
GABA - Ácido Gama-aminobutírico
GPx - Glutathione Peroxidase
GST - Glutathione S-transferase
IG - Imunoglobulinas
MCP - Memória de Curto Prazo
MLP - Memória de Longo Prazo
NCAM - Molécula de Adesão Celular Neural
NPSH - Tióis Não Proteicos
O₂ - Oxigênio
PSA - Ácido Polissialico
PST - Polissialiltransferase-1
RLs - Radicais Livres
RNA_m - Ácido Ribonucleico Mensageiro
SNC - Sistema Nervoso Central
STX - Sialiltransferase-X
TBARS - Ácido Tiobarbitúrico e
TrxRs - Tioredoxina redutase
δ-ALAD - Ácido δ-aminolevulínico Desidratase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1. Envelhecimento Populacional.....	20
3.2. Radicais livres, estresse oxidativo e envelhecimento.....	21
3.3. Memória.....	23
3.4. Envelhecimento e memória.....	25
3.5. Neuroplasticidade.....	26
3.5.1. Moléculas de adesão celular neuronal (NCAM).....	27
3.5.2. Acetilcolinesterase (AChE).....	28
3.5.3. Níveis de Colesterol.....	31
3.6. Selênio.....	33
3.6.1. Selênio e neuroproteção.....	35
3.6.2. Compostos Orgânicos de selênio.....	36
3.7. Quinolinas e Cloroquinolinas.....	40
3.8. 7-cloro-4-(fenilselanil)quinolina (4-PSQ).....	42
4. Resultados.....	47
4.1. Artigo 1.....	48
4.2. Manuscrito 1.....	60
5. Discussão.....	93
6. Conclusões.....	100
7. Perspectivas.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
ANEXOS.....	138

1. INTRODUÇÃO

O envelhecimento é um processo biológico complexo, caracterizado por alterações estruturais e funcionais das células e tecidos, podendo levar a redução das funções cognitivas e aumentar a susceptibilidade a doenças associadas à idade (SIQUEIRA et al., 2004; SIQUEIRA et al., 2005; PARADIES et al., 2011). No Brasil, no ano de 2055, as projeções do IBGE estimam que a população idosa será o dobro da população jovem (IBGE, 2018).

Dentre as diversas capacidades cognitivas afetadas pelo envelhecimento, o aprendizado e a memória têm sido foco de grande interesse nas pesquisas clínicas. A memória humana pode ser definida de maneira geral e concisa como a capacidade neurocognitiva para codificar, armazenar e recuperar informações. O declínio da memória figura como uma das queixas mais frequentes na população idosa, e o reconhecimento dos mecanismos envolvidos no curso do déficit de memória ao longo do tempo ainda é um desafio para a ciência. Entretanto, por se tratar de um processo biológico multifatorial, muitos autores mostram que os fatores nutricionais estão envolvidos nos processos metabólicos relacionados com o comprometimento cognitivo e surgimento de doença demencial (RÖNNLUND et al., 2005; DEL PARIGI et al., 2006; ZAMROZIEWICZ et al., 2017, ARPAWONG et al., 2017).

A suplementação alimentar ou farmacológica com antioxidantes poderia ser uma alternativa interessante, a fim de mitigar os danos associados à idade (PALANIYAPPAN e ALPHONSE 2011). Existe um crescente interesse na compreensão do papel biológico do selênio, em particular o seu papel fisiológico na saúde humana, na prevenção de doenças, e seu uso potencial como um agente terapêutico (PAPP et al., 2007). O humor e a cognição são exemplos de aspectos fisiológicos modificados pela ingestão de selênio (BERR et al., 2000; BENTON, 2002). Desta forma, torna-se mais evidente que o selênio desempenha um papel crítico na manutenção do funcionamento adequado do sistema nervoso. Nosso grupo de pesquisa tem, nos últimos anos, demonstrado o efeito farmacológico de compostos orgânicos contendo selênio (DUARTE et al., 2017; PINZ et al., 2016;

REIS et al., 2017; SALGUEIRO et al., 2017; SAVEGNAGO et al., 2013; SILVA et al., 2017; VOGT et al., 2018, VOSS et al., 2018).

Em adição aos compostos orgânicos de Se, os derivados de quinolina possuem promissoras atividades biológicas, sendo encontrados em produtos naturais farmacologicamente ativos (BERNOTAS et al., 2010; VANDEKERCKHOVE e D'HOOGHE, 2015) e usados na clínica (VANDEKERCKHOVE e D'HOOGHE, 2015; CHUNG et al., 2015). Neste contexto, o anel quinolínico tem atraído grande atenção no campo do desenvolvimento de drogas e avanços tem sido realizados com o objetivo de sintetizar novos compostos derivados de quinolina. Estudos demonstram que esta classe de compostos heterocíclicos possuem várias propriedades farmacológicas, tais como antimicrobianas (CUNY et al., 2010), anticarcinogênicas (ZHANG et al., 2007), anti-inflamatórias (SILVA et al., 2017), anticonvulsivantes (WILHELM et al., 2014), bem como antioxidante (PINZ et al., 2016).

Atualmente, o composto 7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina (4-PSQ) vem demonstrando propriedades farmacológicas promissoras (PINZ et al., 2016; VOGT et al., 2018). A importância dessa tese está relacionada com o interesse em investigar o efeito do 4-PSQ na memória e no estresse oxidativo, pois a demência apresentada por pessoas idosas gera custos sócios-econômicos importantes na sociedade contemporânea e um prejuízo na qualidade de vida dos indivíduos.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar o possível efeito do composto 7-cloro-4-(fenilselanil) quinolina (4-PSQ) em atenuar a disfunção cognitiva e o envolvimento do estresse oxidativo e da neuroplasticidade em ratos envelhecidos.

Objetivos específicos:

- ❖ Avaliar a ação do derivado sintético de quinolina como agente terapêutico na amenização da perda da memória e dos danos cognitivos causados pelo envelhecimento;
- ❖ Avaliar os possíveis efeitos do 4-PSQ na melhora da neuroplasticidade em estruturas cerebrais (córtex e hipocampo) de ratos velhos;
- ❖ Avaliar o possível envolvimento da atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em córtex e hipocampo de ratos velhos tratados com o 4-PSQ;
- ❖ Determinar os níveis séricos de colesterol dos animais.
- ❖ Avaliar os marcadores séricos de dano renal e hepático nos ratos velhos, bem como a ação do composto em estudo;
- ❖ Avaliar a capacidade de reversão do composto 4-PSQ frente a parâmetros de estresse oxidativo e na inibição da enzima ácido δ-aminolevulínico desidratase (δ-ALAD).

- ❖ Avaliar o potencial efeito antioxidante do 4-PSQ causado pelo envelhecimento em diferentes tecidos de ratos Wistar.
- ❖ Determinar a concentração sérica de selênio elementar nos diferentes grupos de animais em estudo.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Envelhecimento populacional

Nas últimas décadas o envelhecimento populacional transformou-se em uma característica mundial. Em 2000, aproximadamente 10% da população global era idosa, com previsão de crescimento acima de 20% para 2050. De acordo com o relatório de 2015 das Nações Unidas sobre a idade da população mundial (UNITED NATIONS, 2015), o número de pessoas com 60 anos ou mais em todo o mundo está projetada para mais que dobrar nos próximos 35 anos, atingindo quase 2,1 bilhões de pessoas. A maior parte desse crescimento virá a partir das regiões desenvolvidas do mundo, sendo os idosos com mais de 80 anos de idade, o segmento de crescimento mais rápido da população em algumas regiões.

No Brasil, a projeção é que para o ano de 2050 cerca 65 milhões de indivíduos sejam considerados idosos (IBGE, 2016). Ainda, segundo as projeções do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016) a expectativa de vida dos brasileiros alcançará o patamar de 81,29 anos em 2050. Este índice de vida pode ser comparado ao de países desenvolvidos e de alta densidade demográfica, como a Islândia (80,80 anos), a China (82,20 anos) e o Japão (82,60 anos). Dentre as capitais brasileiras, a cidade de Porto Alegre é a segunda com maior número de indivíduos idosos, com 211.896, correspondendo a uma taxa de 13,5% da população total da cidade (IBGE, 2016).

Apesar das melhorias na expectativa de vida, a doença de Alzheimer e processos neurodegenerativos tornaram-se as doenças mais temidas pelos idosos. Quase todos os cérebros envelhecidos possuem características ligadas a neurodegeneração, porém, questiona se essas marcas representam aspectos menores do envelhecimento cerebral não afetando a sua função ou se elas são precursoras de doenças neurodegenerativas. No organismo em envelhecimento, o cérebro parece ser suscetível a sinais celulares intrínsecos e locais. Alguns estudos com modelos animais sugerem que sinais ao estresse no sistema circulatório podem

acelerar ou retardar aspectos do envelhecimento cerebral e da função cognitiva (SOSA-ORTIZ et al., 2012).

Dentre as alterações fisiológicas decorrentes do processo de envelhecimento, as funções do sistema nervoso central (SNC), principalmente as envolvidas no processo cognitivo, como o aprendizado e memória, constituem os principais alvos de pesquisas realizadas sobre senescência, em virtude das constantes queixas por essa população idosa (NYBERG et al., 2012).

Radicais livres, estresse oxidativo e envelhecimento

Em 1956, Harman postulou a teoria dos radicais livres. O autor mostrou que a ação deletéria dos radicais livres nas células e tecido conectivo seria responsável pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas à esse (HARMAN, 1956). As espécies reativas (ERs) são moléculas que englobam uma série de espécies radicalares ou não radicalares. As ERs podem ou não apresentar elétrons desemparelhados. Dentre as ERs estão os radicais livres (RLs), os quais são moléculas que apresentam um ou mais elétrons não pareados, capazes de se ligarem com muita facilidade a moléculas vizinhas. Na busca de estabilidade, estes RLs podem desencadear reações capazes de danificar e desestabilizar outras moléculas, fazendo com que ocorra a formação de novas espécies altamente reativas que continuam a propagar o dano oxidativo (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 2015). Sendo assim, quando as ERs são encontrados em excesso, elas podem causar vários danos nos tecidos e as reações que os radicais livres causam estão associadas com danos a lipídeos da membrana celular, proteínas, carboidratos e DNA, afetando suas funções biológicas (BENDICH, 1993; SOHAL et al., 1993; YU, 1995).

Dentre as principais estruturas reativas e com maior potencial para gerar radicais livres estão as espécies reativas de oxigênio (EROs) (BERTOLIN, FURLONG e COSTA, 2006). O oxigênio (O_2) é metabolizado pela mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons. Na parte terminal da cadeia de transporte de elétrons, a enzima citocromo oxidase remove um elétron de cada uma das quatro moléculas reduzidas de citocromo c, oxidando-as, e adiciona os quatro elétrons ao O_2 para formar água (processo que ocorre em torno de 95 a 98 % do oxigênio consumido pelos tecidos). Os 2 a 5 % restantes são convertidos em EROs

(SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). Existem outras moléculas derivadas dos EROs, que também são reativas, e que não podem ser chamadas de radicais livres, pois não possuem elétrons desemparelhados, mas se enquadram dentro da designação de EROs. Existem também outros compostos reativos como as espécies reativas de nitrogênio que também tem um papel importante na gênese das lesões celulares e teciduais (DREW e LEEUWENBURGH, 2002; MOTA, FIGUEIREDO e DUARTE, 2004;).

Os RLs são produzidos de forma contínua no organismo, como parte do metabolismo, por isso existe um complexo sistema de defesa que permite um equilíbrio entre a produção desses e a ativação dos antioxidantes, os quais tem função de proteção contra danos oxidativos. No entanto, o organismo fica vulnerável a danos produzidos por RLs, sob determinadas condições, tais como, quando os sistemas de defesa são ineficientes, ou na presença de doenças que não permitem a absorção de antioxidantes ou a síntese adequada de enzimas para destruir as EROs e reparar o dano (JIMENEZ et al., 2005). Algumas condições exógenas, como, exposição à luz ultravioleta, fumaça de cigarro, e outros poluentes ambientais também estão relacionadas com o aumento da formação de RLs pelo organismo (BENDICH, 1993).

Os RLs apresentam algumas características significantes que podem estar associadas com a maneira como esses podem influenciar no processo de envelhecimento. Podemos citar o fato de serem componentes indissociáveis do metabolismo de um organismo normal, e as suas reações com outros componentes biológicos terem a capacidade de causar efeitos deletérios direta e indiretamente sobre a estrutura e função celular e, ainda, possuem capacidade de interagir com componentes genéticos intrínsecos para modificar o curso do envelhecimento (FARMER e SOHAL, 1989; DEAN et al., 1992; CHAUDHARY et al., 1994).

O conceito de estresse oxidativo foi oriundo de reformulações na Teoria dos RLs, a partir da identificação de EROs e outras moléculas reativas potencialmente geradoras de RLs, aliada ao reconhecimento dos processos antioxidantes e dos sistemas de reparação (YU, 1996). O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes a favor dos primeiros (FREI, 1999). Portanto, ele pode ser produzido tanto por excesso de RLs, quanto por ineficácia dos sistemas de defesa antioxidante (MCARDLE, VASILAKI e JACKSON, 2002). Os antioxidantes podem ser considerados uma substância que, quando

presente em baixas concentrações em relação às concentrações dos substratos oxidáveis, retarda ou inibe, a oxidação desses substratos por RLs (SIES, 1997). Os mecanismos antioxidantes do organismo atuam contra os RLs de diversas maneiras: 1) prevenção (prevenindo a formação de radicais hidroxila, por exemplo); 2) interceptação (varrendo o excesso de espécies oxidativas através de enzimas como a superóxido dismutase e a catalase, por exemplo); 3) reparação (reparando ou eliminando biomoléculas danificadas através de enzimas como a glutathione peroxidase, glutathione reductase e a metionina-sulfóxido reductase) (NÚÑEZ-SELLÉS, 2005).

A capacidade antioxidante de um organismo depende, não só do papel específico de cada mecanismo antioxidante, mas também da cooperação entre os mesmos, de modo a proteger as células dos potenciais efeitos nocivos das EROs (MOTA, FIGUEIREDO e DUARTE, 2004). Existe uma variabilidade destas defesas antioxidantes entre as espécies, mas a sua existência é universal entre os organismos com metabolismo aeróbio. Essa universalidade sugere que a proteção contra os potenciais efeitos deletérios dos radicais livres é essencial para a sobrevivência das células (BECKMAN e AMES, 1998). Há crescentes evidências de que o estresse oxidativo, desencadeia alterações bioquímicas nas células. Essas alterações são importante fator contribuinte em várias doenças crônicas tais como a aterosclerose e doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, neoplásicas e, provavelmente, do processo de envelhecimento em si (MINELLI et al., 2009; SERRA et al., 2009).

Memória

Dentre todas as funções cognitivas, a memória é considerada uma das mais importantes, pois é fundamental para o desenvolvimento da linguagem, da consciência de quem somos e do reconhecimento de pessoas e objetos (YASSUDA et al., 2006). O aprendizado é o processo resultante da interação do indivíduo com o meio ou de representações que possibilitam aquisição de novas habilidades ou informações. A memória, por sua vez, compreende o conjunto de mecanismos que operam no SNC para que o aprendizado ocorra (IZQUIERDO et al., 1988).

A memória pode ser definida como um processo de aquisição, formação, conservação e evocação de informações. A aquisição é também chamada de

aprendizado ou aprendizagem, visto que só é gravado o que foi aprendido. A evocação é também chamada de recordação, lembrança, recuperação, uma vez que só é possível lembrar aquilo que foi aprendido (IZQUIERDO, 2011).

Sendo assim, a formação da memória requer modificações celulares e moleculares que ocorrem na fase de consolidação. Após, a memória é armazenada em um estado estável e durante a evocação, torna-se lábil novamente, necessitando de processos, como a transcrição e a tradução gênica, ativação de receptores, entre outros mecanismos, para sua manutenção (LEE et al., 2005; da SILVA et al., 2008). A reconsolidação da memória mantém e acrescenta novas informações à memória antiga, enquanto que a extinção permite formar nova memória com significado diferente da memória original (IZQUIERDO et al., 2002).

É na etapa da evocação onde se tem informações retidas, também chamada de recordação ou lembrança. No momento da evocação, o cérebro deve recriar, em instantes, memórias que levam horas para serem formadas, e nesse momento, ocorre uma reativação das redes sinápticas de cada memória específica. É bem reconhecido o fato de que quanto mais informações ou “dicas” forem dadas a respeito da memória a ser evocada, mais rápido e fácil ela será lembrada, por uma maior ativação destas redes neuronais (IZQUIERDO, 1998; IZQUIERDO, 2006).

Em alguns casos podem acontecer os chamados “brancos” da memória, que são déficits associados à evocação, e não afetam a memória consolidada, que permanece intacta, somente não expressa. Estes eventos podem ocorrer devido a situações de estresse ou ansiedade excessiva, ou também serem causados pela atuação de glicocorticoides em excesso no hipocampo ou na amígdala basolateral (IZQUIERDO, 2006).

As funções envolvendo o armazenamento de informações emergem como resultado do funcionamento do SNC e envolvem a participação de certas estruturas encefálicas na formação das memórias (OFEN et al., 2012). O hipocampo compõe o sistema límbico e é uma estrutura subcortical do lobo temporal. O hipocampo tem uma função fundamental na formação de memórias declarativas de curta e longa duração, e diferentes áreas corticais interagem com o hipocampo para regular a aquisição e o armazenamento de novas informações (KANDEL, 1997; IZQUIERDO et al., 1998).

Envelhecimento e memória

Diversas mudanças no funcionamento da memória já foram bem documentadas, e são esperadas durante o envelhecimento saudável (YASSUDA et al., 2002; GRADY 2013). Embora tais mudanças possam ter impactos negativos, isto não ocorre de maneira uniforme e devastadora (ARGIMON e STEIN, 2005). Além disso, há grande variabilidade entre os indivíduos no que se refere à intensidade dos efeitos do envelhecimento na memória, especialmente por se tratar de uma característica multifatorial (YASSUDA et al., 2006). Por exemplo, sabe-se hoje que a velocidade do processamento das informações, importante à formação de novos traços de memória, é menor nos adultos mais velhos do que nos jovens. Isto é, em média, um senhor de 65 anos necessitará de mais tempo para processar (ler, compreender, memorizar) as informações da primeira página do jornal do que seu neto de 20 anos. Sabe-se também que o declínio que ocorre com a idade na memória para fatos, também chamada de memória episódica, é mais acentuado do que o declínio que ocorre na memória semântica, que é usada para materiais linguísticos (CANÇADO e HORTA 2006).

Embora estudos sejam conduzidos para investigar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de envelhecimento normal, ainda não está totalmente esclarecido como este processo interfere na redução das funções neuronais e gliais e na disfunção cognitiva (WEINERT e TIRIMAS, 2003). Evidências experimentais têm sugerido que as modificações do microambiente do encéfalo senescente estão associadas ao estresse oxidativo, ao aumento da reatividade microglial e à inflamação crônica (SIQUEIRA et al., 2005).

Dentre as diversas capacidades cognitivas afetadas pelo envelhecimento, o aprendizado e a memória têm sido de grande interesse nas pesquisas clínicas e na área básica. Definir a memória e o aprendizado é uma tarefa difícil, visto que são muitas as perspectivas possíveis para o estabelecimento de marcos conceituais (HEBERT et al., 1995; FERRI et al., 2005).

Além disso, estudo anterior realizado demonstrou que ratos entre 22 e 24 meses de idade apresentam um prejuízo significativo da memória de reconhecimento quando comparados a ratos adultos jovens (de LIMA et al., 2005). O teste de reconhecimento do objeto desenvolvido por Ennaceur e Delacour (1988) tem sido utilizado como uma ferramenta experimental para buscar novos

tratamentos na memória e para investigar os mecanismos neurais do processo de memória e aprendizado (EACOTT e NORMAN, 2004).

Neuroplasticidade

A neuroplasticidade congrega diversos processos de vital importância pelos quais o cérebro percebe, se adapta e responde à uma variedade de estímulos internos e externos. As manifestações da neuroplasticidade no sistema nervoso central adulto são caracterizadas como alterações na função dendrítica, reestruturação sináptica, brotamento axonal, extensão do neurônio, sinaptogêneses e neurogêneses (MESULAM, 1999).

Nesse contexto, a neuroplasticidade pode ser estrutural e funcional. A neuroplasticidade estrutural inclui um conjunto de processos que vão desde a neurogênese e sinaptogênese até a expressão de fatores neurotróficos e angiogênicos. A neuroplasticidade funcional envolve um conjunto de processos os quais não causam mudanças na estrutura cerebral (HUANG et al., 2014). No entanto, é importante destacar que os processos cerebrais relacionados à neuroplasticidade funcional e processos cerebrais relacionados à neuroplasticidade estrutural interagem entre si. Portanto, ambos os tipos de neuroplasticidade não podem ser considerados como conceitos categóricos e/ou processos independentes (CESPÓN et al., 2018).

A flexibilidade do cérebro envolve um aumento da eficiência no processamento de informações e/ou gerenciamento de demandas, que não exigem modificações cerebrais, mas sim o uso de circuitos alternativos disponíveis que permitem ao cérebro gerenciar demandas ambientais ou cognitivas de forma mais eficiente. Assim sendo, o aumento da neuroplasticidade transmite maior flexibilidade cerebral (LÖVDÉN et al., 2010).

Sendo assim, alterações no equilíbrio da plasticidade neural estão associadas a várias doenças neuropsiquiátricas. Sabendo que algumas mudanças cerebrais ocorrentes com o envelhecimento incluem mudanças nos neurotransmissores, a avaliação da concentração de neurotransmissores juntamente com a avaliação de algum desequilíbrio na plasticidade cerebral tornam-se bons marcadores do dano cerebral (CANÇADO e HORTA, 2002).

Moléculas de adesão celular neuronal (NCAM)

A molécula de adesão celular neural (NCAM) é uma glicoproteína de membrana pertencente à superfamília das imunoglobulinas (Ig), codificada pelo gene NCAM1, sendo expressa na superfície de neurônios, células gliais, musculares esqueléticas e natural killers. Dessa forma, essa glicoproteína influencia na proliferação, no crescimento, na diferenciação e na sobrevivência destas células (GUBKINA et al., 2001).

Pelo menos 27 diferentes RNAs de NCAM são produzidos, gerando uma grande diversidade de isoformas de NCAM (REYES et al., 1991). NCAM medeia a adesão celular através de um sítio homofílico, bem como através de interações heterofílicas. O domínio extracelular da NCAM consiste de cinco domínios semelhantes às imunoglobulinas (Ig), seguidos de dois domínios de fibronectina de tipo III (FNIII). Os diferentes domínios da NCAM mostraram ter papéis diferentes, com os domínios Ig sendo envolvidos na ligação homofílica à NCAM, e os domínios FNIII estarem envolvidos na sinalização relacionada ao crescimento de neurônios (KISELYOV et al., 2005).

A NCAM promove o crescimento de neurônios pela via homofílica (NCAM-NCAM) bem como heterofílica (NCAM-receptor do fator de crescimento de fibroblastos), sendo que estas interações ativam a cascata de sinalização intracelular. A adesão celular mediada por NCAM induz a ativação de - proteína cinase II alfa dependente de calmodulina, que então ativa proteína tirosina fosfatase- α do tipo receptor e promove a ativação de proteína tirosina cinase Fyn, resultando na estimulação de cinase de adesão focal e crescimento e sobrevivência neuronal. As interações homofílicas de NCAM também estimulam o recrutamento de proteína associada ao crescimento-43, resultando na formação do complexo spectrina-proteína associada ao crescimento-43- proteína cinase C beta2, que promove remodelamento do citoesqueleto e crescimento de neuritos (WALMOD et al., 2004). A literatura mostra que essa sinalização intracelular induzida por NCAM é dependente da concentração de cálcio citoplasmático (KIRYUSHOKO et al., 2006). Mediando a adesão celular para outras células e para a matriz extracelular, a NCAM influencia na migração, fasciculação e formação de sinapses no cérebro (STOENICA et al., 2006; SENKOV et al., 2006). Essa ação direta da NCAM na plasticidade

neuronal leva a modificações no aprendizado e na regeneração nervosa (KISELYOV et al., 2005; WALMOD et al., 2004).

As glicoformas NCAM podem ser modificadas pós-traducionalmente pela adição de ácido polissialílico (PSA). A polissialilação da NCAM é catalisada por duas sialiltransferases, sialiltransferase-X (ST8Sia II/STX) e polissialiltransferase-1 (ST8Sia IV/PST) (JAKOVCEVSK et al., 2007; OLTMANN-NORDEN et al., 2008). Por elevar a massa molecular das isoformas de NCAM, a polissialilação aumenta o raio hidrodinâmico da sua região extracelular, com o consequente alargamento do espaço intermembrana e ruptura das propriedades adesivas da NCAM e outras moléculas de adesão. A este respeito, a PSA-NCAM é considerada um inibidor global da adesão celular, diminuindo as propriedades de ligação homofílica da NCAM, o que leva à redução da adesão celular e, assim, facilitam a migração celular e invasão (von DER OHE et al., 2002; CHARLES et al., 2000).

A redução da expressão nos níveis NCAM foram associadas com comprometimento da memória, depressão, distúrbios do espectro autista e esquizofrenia (AONURM-HELM et al., 2016). Na doença de Alzheimer, onde os depósitos de placas afetam a rede de proteínas neurofibrilares, os eventos de neurodesenvolvimento mediados por NCAM na formação de memória estão inibidos, e no envelhecimento, a perda de neurônios pode limitar as mudanças de conectividade sináptica associadas com a aquisição e consolidação da memória (NIZZARI et al., 2012).

Um estudo desenvolvido por Bisav e colaboradores (2013) mostrou que a expressão da NCAM está diretamente relacionada com uma maior vulnerabilidade para o desenvolvimento de distúrbios cognitivos induzidos pelo envelhecimento em tarefas de aprendizagem e memória que dependem criticamente da integridade funcional do córtex pré-frontal e do hipocampo. Estes resultados elucidaram que os deficits de NCAM podem resultar em uma diminuição na plasticidade estrutural em redes neuronais relevantes, as quais são necessárias para mediar processos de memória de trabalho/episódico.

Acetilcolinesterase (AChE)

O declínio cognitivo é uma das síndromes geriátricas associadas a um aumento do risco de mortalidade prematura. Foi descrito a relação do déficit

cognitivo com vários mecanismos que poderiam explicar essa associação (SOYSA et al., 2016; NASEER et al., 2016). Um desses mecanismos corresponde a ocorrência de ações repetidas e transtornos comportamentais devido à memória episódica e comprometimento na atenção devido à deficits colinérgicos. A formação de memória é modulada por vários sistemas de neurotransmissores, entre eles o sistema colinérgico (UWANO et al., 2012; SCHOFIELD et al., 2014).

O sistema colinérgico desempenha um papel essencial nos processos de aprendizado e memória. A transmissão colinérgica (Figura 1) é baseada em proteínas que estão envolvidas na síntese, estocagem, transporte e degradação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016).

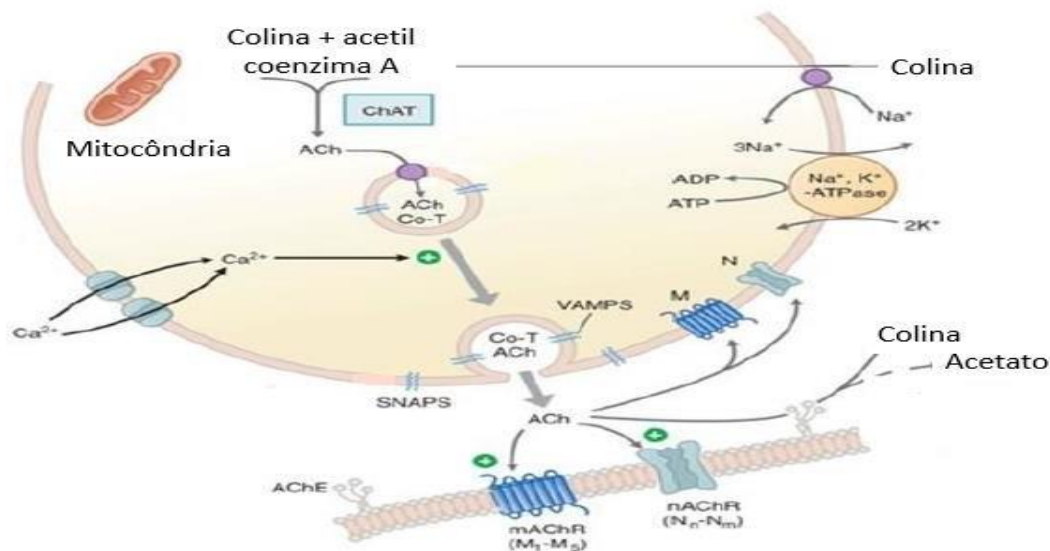


Figura 1. Representação de uma sinapse da via colinérgica. Siglas: Acetilcolina (ACh); AChE (Acetilcolinesterase); Colina acetiltransferase (ChAT); Adenosina difosfato (ADP); Adenosina trifosfato (ATP); Proteína de membrana associadas à vesículas (VAMP5); Proteínas sinaptossômicas (SNAPS); Receptores nicotínicos (nAChR); Receptores muscarínicos (mAChR); Transportador vesicular de acetilcolina (ACh co-T). Adaptado de BRUNTON et al., (2011).

A síntese de ACh ocorre nos terminais nervosos dos neurônios colinérgicos a partir de dois precursores, a colina e a acetil-coenzima A. A colina acetiltransferase (ChAT) catalisa a síntese de ACh que, por sua vez, pode interagir com receptores colinérgicos pré- e pós-sinápticos. A ChAT é ativada quando há despolarização, influxo de cálcio e fosforilação por diversas proteínas quinases. À medida que o neurônio colinérgico é despolarizado, a ACh é liberada na fenda sináptica por exocitose, e assim ativa seus receptores. Posteriormente, o neurotransmissor é rapidamente inativado pela Acetilcolinesterase (AChE), enzima que está geralmente

presente na membrana plasmática de neurônios da fenda sináptica (DEIANA et al., 2011).

O neurotransmissor ACh liga-se a duas classes de receptores: os receptores colinérgicos nicotínicos, de ação ionotrópica, e os receptores colinérgicos muscarínicos, de ação metabotrópica (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016). Os primeiros, ao serem ativados, permitem o influxo de íons como Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , e após sua ativação há uma despolarização e excitação celular, assim essa resposta intracelular resulta em uma atividade modulatória no SNC. Centralmente, a estimulação desses receptores facilitam a liberação de diversos neurotransmissores, como o glutamato, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina e ACh. Por sua vez, a alta concentração de ACh está envolvida nos processos de memória e aprendizado (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016).

Já os receptores muscarínicos, que são os mais abundantes, pertencem à classe dos receptores acoplados à proteína G (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016). Os estudos de clonagem identificaram cinco subtipos de receptores muscarínicos: M1-M5. Os ímpares, M1 (presentes no SNC e glândulas exócrinas), M3 (presentes no SNC, pulmão, íleo) e M5 (SNC), ligam-se preferencialmente à proteína $\text{G}_{\alpha q}$ e o seu segundo mensageiro é a fosfolipase C, que produz uma resposta celular excitatória. Além disso, pressupõe-se que os subtipos M1 e M5 estão mais presentes no cérebro, principalmente o M1, que é requerido para a ativação de enzimas importantes envolvidas com a plasticidade sináptica. Já os M2 (presentes no SNC, coração, pulmão e íleo) e M4 (presentes no SNC e pulmão) são acoplados à proteína $\text{G}_{\alpha i}$, e podem afetar a adenilato ciclase promovendo assim uma diminuição da excitabilidade celular (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016).

A degradação, armazenamento e produção da ACh acontecem em diferentes seres vivos, como bactérias, protozoários, fungos e plantas, além dos animais (FRAGA, 2010). A degradação imediata da ACh é essencial para que as transmissões sinápticas colinérgicas ocorram antes da chegada de um novo impulso nervoso (SANTOS, 2009). A retirada da ACh da fenda sináptica é fundamental para o funcionamento normal das sinapses. Caso um neurotransmissor permaneça por um período prolongado na fenda sináptica, o neurônio pós-ganglionar, fibra muscular e célula glandular seriam influenciados (TORTORA e DERRICKSON, 2010).

No sistema nervoso, a AChE é uma das mais onipresentes enzimas nas vias colinérgicas centrais (GEULA e MESULAM, 1999). Esta enzima desempenha

um importante papel hidrolisando a ACh e terminando, assim, com a ação sináptica deste neurotransmissor (SOREQ e SEIDMAN, 2001). A hidrólise da ACh por meio da catálise da AChE, forma colina e acetato, com a liberação de um próton. A inibição da AChE e o aumento nas concentrações de ACh são requeridos para a melhora da memória e do aprendizado (FERREIRA-VIEIRA et al., 2016). Entretanto, dependendo da extensão da inibição na atividade da AChE, não acontece a hidrólise da ACh na fenda sináptica, provocando acúmulo anormal deste neurotransmissor, conduzindo a uma grande estimulação, que leva a alterações muitas vezes indesejadas, tais como asfixia, hiperatividade, e finalmente a morte (SANTOS, 2009).

Além disso, estudos demonstram que a AChE tem função na reciclagem de neurotransmissores, proteólise, neurogênese, morfogênese, diferenciação neural e até mesmo na formação das fibrilas amiloides (INESTROSA et al. 1996; KOENIGSBERGER et al. 1997). A versatilidade funcional da AChE tem diferentes implicações no desenvolvimento neocortical (DORI et al., 2005), cognição (KARVAT e KIMCHI et al., 2014), resposta ao estresse (MESHORER et al., 2005), tumores neuronais e não neuronais (VIDAL, 2005; XI et al., 2015), e transmissão nervosa tardia no sistema nervoso periférico de pacientes diabéticos (GARCIA et al., 2012).

Alterações no sistema colinérgico durante o envelhecimento têm sido documentado através da avaliação de um dos principais componentes funcionais na degradação de ACh, ou seja, a partir da avaliação da atividade da AChE (SCHLIEBS e ARENDT, 2011). Paralelamente, a AChE também demonstrou estar envolvida em diferentes processos celulares, incluindo aderência celular (SHARMA et al., 2001) e apoptose (JIANG e ZHANG, 2008; ZHANG e GREENBERG, 2012).

Níveis de colesterol

Com a implantação dos biomarcadores clínicos, surgiu um ímpeto para a aplicação desses marcadores na detecção pre-clínica de doenças neurodegenerativas. Este tem sido um dos pilares do desenvolvimento contínuo de terapias modificadas e tratamentos preventivos. Perfis de fosfolipídios no sangue atualmente vem sendo investigados como uma alternativa viável para a predição da atividade neurodegenerativa (MAPSTONE et al., 2014). Os biomarcadores da

desregulação metabólica envolvidos na hipercolesterolemia e resistência à insulina, mostraram possuir relações inversas com funções cognitivas (FARR et al., 2008) como a formação de memória (FRAZIER et al., 2015).

Os carboidratos simples e gorduras saturadas são os principais componentes da dieta ocidental que promovem obesidade e resistência à insulina (GROSS et al., 2004). Dados clínicos de estudos epidemiológicos e em animais indicam que o seu consumo excessivo afeta o cérebro, particularmente durante o envelhecimento. Um estudo epidemiológico de grandes populações sugere que os indivíduos com uma alta ingestão calórica possuem um maior risco de desenvolver doença de Alzheimer (LUCHSINGER et al., 2002). Além disso, estudos em animais mostraram que a estrutura e a função do hipocampo, uma região do cérebro crítica para certas formas de cognição, é afetado pela obesidade e hiperlipidemia (MOLTENI et al., 2002; FARR et al., 2008).

Os mecanismos pelo qual a dislipidemia influencia a estrutura e a função do cérebro não estão bem elucidados, mas Fridlyand e Philipson (2006) evidenciam estar relacionado com aumento do estresse oxidativo e metabolismo lipídico perturbado. Os danos oxidativos a proteínas e aos lipídios ocorrem em tecidos de indivíduos obesos e diabéticos. A acumulação de esfingolipídios de membrana (por exemplo, ceramidas, gangliosídeos e esfingomielinas), no músculo esquelético, nas células pancreáticas e nas células endoteliais vasculares ocorrem no diabetes e na doença cardíaca aterosclerótica (SUMMERS, 2006).

As dietas ricas em gorduras saturadas e açúcares simples comprometem a expressão de vários fatores neurotróficos que apoiam a plasticidade do hipocampo (MOLTENI et al., 2002; STRANAHAN et al., 2008). Um estudo com ratos velhos submetidos a uma dieta rica em gordura mostrou um déficit cognitivo nesses animais (URANGA et al., 2010), possivelmente através da redução na atividade antioxidante endógena (MORRISON et al., 2010), evidenciando assim o envolvimento do estresse oxidativo como mediador do comprometimento neurocognitivo no envelhecimento. Adicionalmente, Stranahan e colaboradores (2011) descrevem um acúmulo de lipídios no hipocampo em um grupo de ratos que exibem lipídeos séricos significativamente elevados após a exposição a uma dieta rica em açúcar.

Por fim, evidências mostraram que a disfunção do metabolismo do colesterol pode contribuir para a declínio cognitivo em idosos (MARTINS et al., 2009). Estudos em animais e em culturas celulares também sugeriram que as

anormalidades no metabolismo do colesterol potencialmente aumentam o conteúdo neuronal do colesterol, promovendo a clivagem do precursor de proteína amiloide, prejudicando a memória (BAUM et al., 1999; PARADIS et al., 2004; SATHYA et al., 2016).

Selênio

O selênio foi descoberto por J.J. Berzelius em 1817 e inicialmente foi reconhecido como uma toxina quando ingerido em grandes quantidades (EMSLEY, 2011). Contudo, posteriormente o selênio foi determinado como um micronutriente importante para o ser humano, estando envolvido em diversas funções metabólicas e enzimáticas, e relacionado, também, com a prevenção de várias doenças, proporcionando, inclusive, efeito protetor contra alguns tipos de câncer (ALMONDES, 2010).

Adicionalmente, o selênio atua como um mineral versátil, sendo reconhecido por seu envolvimento em diversas funções fisiológicas em mamíferos, tais como: defesa antioxidante, fertilidade, metabolismo do hormônio da tireoide e resposta imune (SCHOMBURG, 2012; YOUN et al., 2008; TONDO et al., 2010). Como outros elementos traços, o selênio é um constituinte natural da crosta terrestre, estando presente também na água. O teor de selênio nos alimentos varia consideravelmente, uma vez o conteúdo de selênio nos alimentos depende do teor regional deste micronutriente. Isso pode variar de níveis tóxicos em regiões de solos seleníferos a regiões formadas por solos pobres, onde os seres humanos sofrem de problemas de saúde por deficiência de selênio (RAYMAN, 2008). No Brasil, os estudos demonstraram que o país apresenta divergências no conteúdo mineral nos solos, o que tem reflexos diretos na ingestão alimentar de selênio. Estados como São Paulo e Mato Grosso apresentaram os menores níveis do mineral em refeições analisadas em laboratório (FAVARO et al., 1997; BOAVENTURA, 1991). Por outro lado, no Amazonas e em Santa Catarina, foram encontradas as maiores concentrações (YUYAMA et al., 1997). Para manter um balanço de selênio de zero (onde o selênio consumido é igual à excreção de selênio na urina e fezes), a ingestão necessária segundo a Organização Mundial de Saúde é de 1µg/kg de peso corporal (WHO, GUIDELINES FOR DRINKING-WATER QUALITY). Assim, o equilíbrio do selênio no

corpo é crítico porque os déficits podem levar a problemas neurológicos, problemas cardiovasculares, câncer e deficiências imunológicas, enquanto níveis mais altos resultam em toxicidade (RAYMAN, 2012).

Há duas formas de compostos de selênio na natureza: a orgânica e a inorgânica. Os vegetais absorvem o selênio em sua forma inorgânica a partir do solo, a qual é convertida para a forma orgânica, gerando compostos metilados de baixo peso molecular, além de selenometionina e selenocisteína. A selenometionina é a principal fonte de compostos de selênio presente em produtos vegetais como grãos, legumes e leguminosas. A biodisponibilidade da selenometionina parece ser maior em ratos e humanos e é provável que seja a principal fonte de selênio para organismos vivos (RAYMAN et al., 2008). Ainda, a selenometionina é o principal precursor para a síntese de selenocisteína, a forma mais abundante em produtos de origem animal (RAYMAN, 2012; PAPP et al., 2007).

Em sistemas biológicos, a selenocisteína é reconhecida como o vigésimo primeiro aminoácido, essencial por se diferenciar da cisteína pela presença de um átomo de selênio no lugar de enxofre e provavelmente é a forma mais biologicamente ativa de selênio (STADTMAN, 1996). Entre as funções protetoras atribuídas ao selênio destacam-se, além da atuação no funcionamento do centro catalítico de proteínas (selenoproteínas), a capacidade antioxidante, participação da síntese de hormônios tireoidianos, manutenção e fortalecimento do sistema imune, proteção contra ação nociva de metais pesados e xenobióticos (FINLEY, 2006).

A síntese de selenoproteínas é totalmente dependente da disponibilidade de selênio, e desse modo, também há uma hierarquia na sensibilidade ao consumo do mineral. Nesse sentido, observa-se que algumas selenoproteínas respondem rapidamente à deficiência de selênio com diminuição da sua atividade frente à prolongada e notável depleção (FINLEY, 2006).

O efeito protetor antioxidante do selênio está associado com sua presença na glutathione peroxidase (GPx) e na tireodoxina redutase (TrxRs), enzimas estas que são conhecidas por proteger macromoléculas como DNA, lipídeos e proteínas do dano oxidativo (TRUEBA et al., 2004). Considerando essa atividade antioxidante especialmente no cérebro, algumas selenoproteínas foram caracterizadas como protetoras contra a neurodegeneração através da regulação redox, dentre elas as GPX1 e GPX4 (GARCIA 2009; ZHANG 2010).

Selênio e neuroproteção

Muito conhecimento sobre as funções do selênio no SNC foi adquirido através do estudo da sua relação com a patologia da neurodegeneração, tanto aspectos prejudiciais quanto benéficos. Distúrbios neurodegenerativos, tais como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica e doença de Huntington, representam uma considerável ameaça à saúde humana, causando sérios problemas médicos e encargos econômicos para sociedade (KOZLOWSKI et al., 2012).

A etiologia das desordens neurodegenerativas ainda não está completamente entendida, mas estudos já demonstraram o envolvimento de múltiplos fatores, tanto ambientais quanto genéticos (HARRIS e BLAIN, 2004; BROWN et al., 2005). Além disso, o papel da exposição a oligoelementos e o distúrbio de sua homeostase no cérebro também tem sido discutido (MICHALKE, 2010).

Os estudos sobre a relação do selênio com as patologias neurodegenerativas fornecem evidências sobre a função deste elemento para o SNC (CHEN e BERRY, 2003; PILLAI et al., 2014). A neuroproteção pode ser definida como a manutenção da maior integridade possível de células e interações no cérebro que resultam em função neural não perturbada (CHEN e BERRY, 2003; PILLAI et al., 2014).

Uma vez que pelo menos metade das selenoproteínas estão envolvidas na redução do estresse oxidativo, o principal mecanismo presumido de neuroproteção inclui a remoção de ERs. O cérebro é suscetível ao estresse oxidativo devido ao baixo nível de antioxidantes, alto teor de ácidos graxos poliinsaturados e uma alta demanda de oxigênio (RAYMAN, 2012). Assim, as propriedades neuroprotetoras do selênio podem incluir a estimulação de biossíntese de selenoproteínas antioxidantes. Outro mecanismo de neuroproteção descrito para o selênio é atribuído à sua capacidade de modular o influxo de Ca^{2+} através de canais iônicos, gerando um efeito anti-inflamatório (MCKENZIE et al., 2002; NAZIROGLU, 2009).

Os estudos que avaliam a relação entre os níveis de selênio e o declínio cognitivo sugerem que a deficiência de selênio pode ser um risco para as demências (BERR 2000; GAO 2007; BERR 2012), entretanto os resultados ainda são contraditórios. Cardoso e colaboradores (2010) e Vural e colaboradores (2010) verificaram que pacientes idosos com doença de Alzheimer apresentavam grande

deficiência de selênio quando comparados a idosos saudáveis. Entretanto, Ceballos-Picot e colaboradores (1996) encontraram níveis aumentados de selênio plasmático em pacientes com doença de Alzheimer quando comparados ao grupo controle. Em um estudo da associação entre elementos traços e desempenho cognitivo em diferentes grupos com doenças neurodegenerativas, Smorgon e colaboradores (2014) encontraram uma correlação direta entre as concentrações de selênio plasmático e os níveis de função cognitiva e, dessa maneira, os pacientes com doença de Alzheimer apresentaram níveis reduzidos desse mineral quando comparados ao grupo controle.

Compostos Orgânicos de Selênio

Tendo em vista as importantes propriedades do elemento selênio, numerosos compostos orgânicos contendo selênio têm sido alvos de interesse em síntese orgânica, em virtude da descoberta de suas aplicações sintéticas, além da menor toxicidade em relação às espécies inorgânicas (PARNHAM e GRAF, 1991; KANDA et al., 1999). Diversos estudos tem demonstrado o efeito farmacológico destes compostos, como por exemplo, atividade antioxidante, anti-inflamatória, antinoceptiva, ansiolítica e anticonvulsivante em modelos animais (BRUNING et al., 2012; WILHELM et al., 2014; LUCHESE et al., 2012; PINZ et al., 2016; REIS et al., 2017). A vasta literatura evidencia o efeito destes compostos nos diversos modelos animais, entretanto também existem estudos clínicos em humanos utilizando compostos orgânicos de selênio (YAMAGUCHI et al., 1998; OGAWA et al., 1999).

Dentre os compostos orgânicos de selênio testado em humanos, vale destacar o ebselen (2-fenil-1,2-benzilsoselenazol-3(2H)-ona) (Figura 2) que ganhou destaque desde a década de 80 e até os dias atuais vem sendo testado. Foram demonstrados os efeitos neuroprotetores do ebselen tanto *in vivo* quanto *in vitro* em modelos de isquemia (DAWSON et al., 1995; NAMURA et al., 2001; IMAI et al., 2003), toxicidade glutamatérgica (PORCIÚNCULA et al., 2001; CENTURIÃO et al., 2005), indução de dano à medula espinhal (KALAYCI et al., 2005) e neurotoxicidade por exposição ao metil mercúrio (FARINA et al., 2003). Da mesma forma, é importante ressaltar que o Ebselen foi testado em estudos clínicos para o tratamento de infarto isquêmico agudo e hemorragia subaracnóidea, apresentando melhora relativa no quadro clínico destes pacientes (YAMAGUCHI et al., 1998; SAITO et al.,

1998). Dentre os mecanismos potencialmente envolvidos no neuroproteção pelo ebselen, citam-se a redução da peroxidação lipídica (PORCIÚNCULA et al., 2001), inibição de enzimas envolvidas em processos inflamatórios (lipoxigenases, proteína quinase C, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida, oxidase, H^+/K^+ -adenosinatrifosfatase) (SCHEWE, 1995), interação com peroxinitrito (MASUMOTO e SIES, 1996) e inibição das isoformas da AChE *in vitro* e em animais (MARTINI et al., 2015; MARTINI et al., 2018).

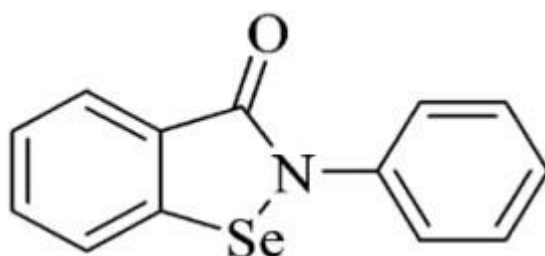


Figura 2. Estrutura química do Ebselen.

Adicionalmente, outro composto que compartilha propriedades químicas com o ebselen é o disseleneto de difenila $[(PhSe)_2]$ (Figura 3). Além da sua propriedade antioxidante em diferentes modelos (ROSSATO et al., 2002; SANTOS et al., 2005; LUCHESE et al., 2007; BORGES et al., 2006), existem vários estudos mostrando seu efeito neuroprotetor (GHISLENI et al., 2003; POSER et al., 2008; de FREITAS et al., 2009; BRITO et al., 2009; de FREITAS et al., 2011; MEINERTZ et al., 2011; BRÜNING et al., 2012; DALLA CORTE et al., 2012; DIAS et al., 2012; LOPES et al., 2012; de OLIVEIRA et al., 2013; GLASER et al., 2013; CECHELLA et al., 2014; DOBRACHINSKI et al., 2014; LEITE et al., 2016; SAMPAIO et al., 2017; ADEDARA et al., 2018). Além disso, torna-se importante ressaltar que o $(PhSe)_2$ apresentou menor toxicidade em relação ao ebselen quando administrado *in vivo* (MEOTTI et al., 2003). Adicionalmente, um estudo conduzido por Cechella e colaboradores em 2014, mostrou que a associação entre uma suplementação dietética com o composto $(PhSe)_2$ e o exercício de nado leva a uma melhora da memória de reconhecimento do objeto novo em ratos velhos.

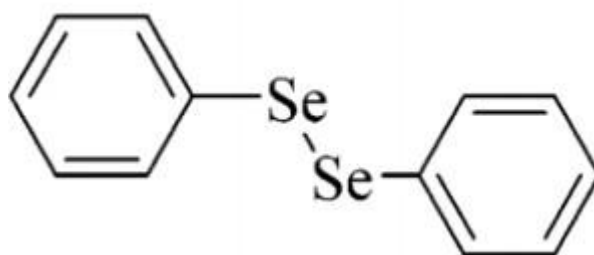


Figura 3. Estrutura química do disseleneto de difenila (PhSe_2).

Em contrapartida, o composto *p*-cloro-difenil disseleneto (Figura 4) foi estudado por Bortollato e colaboradores. Nesse trabalho os autores demonstraram que o composto protegeu contra a ação do tipo depressiva e do déficit cognitivo causado pelo envelhecimento em ratos. Os resultados desse trabalho contribuíram fortemente para que novas pesquisas de intervenções terapêuticas para geriatria com o objetivo de tratar comorbidades da depressão e déficit de memória fossem realizadas.

Outro composto orgânico contendo selênio, o *m*-trifluorometil difenil disseleneto ($m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$)₂, mostrou atividade antinociceptiva e forneceu evidências comportamentais e neuroquímicas para o envolvimento do sistema serotoninérgico nesta ação. A administração do composto reduziu a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de glutamato e os antagonistas dos receptores serotoninérgicos utilizados no estudo bloquearam o efeito do ($m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$)₂ (BRÜNING et al., 2014). Um ano depois, Brüning e colaboradores (2015) publicaram que o ($m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$)₂ foi efetivo em reduzir a alodinia mecânica e o comportamento depressivo de camundongos submetidos a ligadura parcial do nervo ciático, um modelo de comorbidade de dor e depressão. Os autores afirmam que este efeito pode estar associado principalmente a uma ação antiinflamatória do composto, que foi demonstrada pela redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias assim como pela inibição da ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno p38. Esses marcadores estão diretamente relacionados a ligação parcial do nervo ciático e a sua ação é regulada pelo funcionamento dos sistemas glutamatérgico e serotoninérgico.

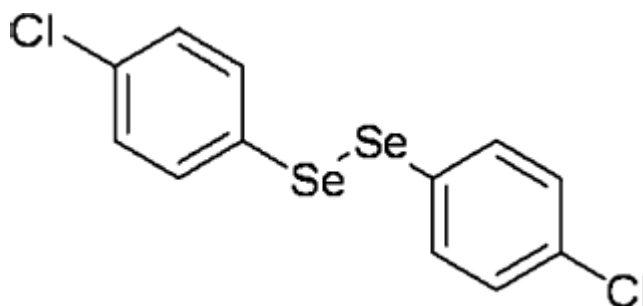


Figura 4. Estrutura química do p-cloro-difenil disseleneto.

Além dos compostos mostrados anteriormente, o tratamento agudo com o composto (Z)-2,3-bis(4-clorofenilselanil) prop-2-en-1-ol (Figura 5) pela via intragástrica melhorou deficits de memória causados por reserpina em ratos (BORTOLATTO et al., 2012). Além disso a administração do composto nas mostrou uma melhora da memória de curto e longo prazo.

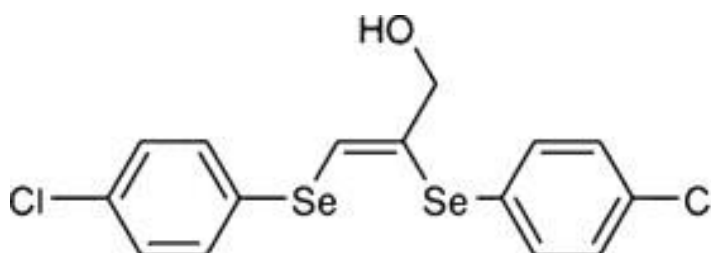


Figura 5. Estrutura química do (Z)-2,3-bis(4-clorofenilselanil)

A injeção intracerebroventricular de estreptozotocina (STZ) foi descrita como um modelo animal apropriado de demência esporádica caracterizada por dano progressivo na memória e presença de estresse oxidativo (ISHRAT et al., 2009). A partir desses dados da literatura, Pinton e colaboradores (2011) confirmaram a perda de memória e estresse oxidativo causado pela STZ no cérebro dos ratos. Além do mais, este estudo demonstrou que o pré-tratamento com o composto p,p'-metoxildifenil diseleneto (MeOPhSe)₂ (Figura 6) protegeu contra o estresse oxidativo induzido por STZ em camundongos, bem como contra o comprometimento da consolidação da memória de reconhecimento. Juntos, esses resultados indicam que a propriedade antioxidante do composto está envolvida com seu efeito protetor

contra o comprometimento cognitivo induzido por STZ em um modelo de demência esporádica.

Posteriormente, verificou-se que a suplementação dietética com o composto (MeOPhSe)₂ reduziu a apoptose e a perda neuronal induzida por STZ. Além do mais, o composto foi capaz de impedir a ativação da microglia e dos astrócitos no hipocampo dos animais, protegendo ainda mais os neurônios. Assim, os dados dos testes comportamentais desse artigo fornecem informações da melhora na memória dos animais e impedimento da perda das sinapses e morte celular, protegendo assim contra a neurodegeneração (PINTON et al., 2012). Outro estudo mostrou que a suplementação dietética com (MeOPhSe)₂ mostrou capacidade antioxidante e foi capaz de restaurar a atividade da AChE (PINTON et al., 2013).

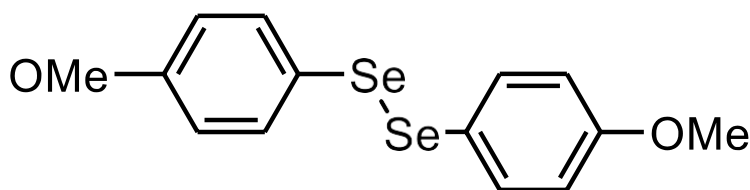


Figura 6. Estrutura química do p,p'-metoxildifenil diseleneto (MeOPhSe)₂

Levando em consideração todos os dados expostos acima, a busca e a investigação das propriedades farmacológicas dos compostos orgânicos de selênio, têm crescido nos últimos anos, tendo em vista que estes apresentam promissoras ações farmacológicas. Desta forma, estes compostos podem vir a ser uma alternativa terapêutica para o tratamento de diversas doenças.

Quinolinas e cloroquinolinas

A quinolina foi isolada, pela primeira vez, no ano de 1934, quando o químico francês Charles Gerhardt provocou a decomposição de um extrato de quinina, obtido de um arbusto da família das Rubiáceas. Os índios da América do Sul já utilizavam extratos de Rubiáceas no tratamento de doenças infecciosas como a malária, que era comum nas florestas tropicais. Alguns anos após o químico francês Hoogewerff

Van Dorp relatou a presença do mesmo núcleo quinolínico em frações de alcatrão de hulha (ACHESON, 1977).

As quinolinas (figura 7) são compostos heterocíclicos aromáticos presentes em uma ampla gama de produtos farmacêuticos naturais e sintéticos. São consideradas estruturas privilegiadas na descoberta de medicamentos, uma vez que podem fornecer ligantes para múltiplas classes de receptores celulares independentes ou de enzimas com elevada afinidade. As quinolinas geralmente são estruturas rígidas formadas por sistemas de múltiplos anéis heterocíclicos capazes de orientar variados modelos de substituintes em um espaço tridimensional bem definido (MONTENEGRO et al., 2011).

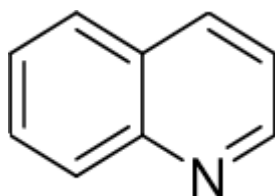


Figura 7. Estrutura química da quinolina.

Os derivados quinolínicos têm recebido a atenção de pesquisadores devido a suas importantes ações farmacológicas, incluindo as propriedades anti-inflamatória, antimalárica, antitumoral, hipoglicemiante, anticarcinogênica, anti-hipertensiva, anti-asmática, anti-histamínica e antidepressiva (NAIK et al., 2009; BHASIN et al., 2010; KAUR et al., 2010; MARELLA, 2012; SHTRYGOL' SIU et al., 2012). Manera e colaboradores (2007) revelaram que derivados de quinolina apresentam ação antinociceptiva *in vivo*, possivelmente devido a sua alta afinidade por receptores canabinóides. Esta classe de compostos também apresenta potente atividade em modelo de dor neuropática em ratos (BARE et al., 2007). Devido ao seu potencial farmacológico, as quinolinas são amplamente utilizadas na clínica. Destacam-se a Bedaquilina, utilizada no tratamento da tuberculose (WHO, 2012) e o Irinotecano empregado para o tratamento do câncer colorretal (NCI, 1996).

Dentre as diferentes classes de quinolinas, as cloroquinolinas constituem o exemplo mais pertinente do potencial de utilização deste núcleo heterocíclico como esqueleto para desenvolvimento de novos fármacos (SOLOMON e LEE, 2009). As

cloroquinolinas são derivados de quinolinas caracterizados por possuírem um átomo de cloro em alguma posição dos anéis heterocíclicos. Além de possuírem potencial anti-inflamatório e serem valiosos agentes para o tratamento do lúpus eritematoso, da artrite reumatoide e da hepatite amebiana, as cloroquinolinas e seus derivados são drogas de escolha para o tratamento da malária, sendo eficazes, de baixo custo e pouco tóxicas para seres humanos (AUGUSTIJNS et al., 1992).

Também é importante ressaltar o potencial antiviral de cloroquinolinas, área na qual já existem ensaios clínicos de atuação antirretroviral para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e antiviral contra a febre chikungunya (MONTENEGRO et al., 2011). Além disso, potencial antinociceptivo, anti-inflamatório e anticonvulsivante de 7-cloroquinolina-1,2,3-triazoil carboxamidas foi demonstrado em camundongos (WILHELM et al., 2014), reforçando a importância desta classe de compostos. Devido a estas inúmeras propriedades, as cloroquinolinas podem ser consideradas compostos promissores no desenvolvimento de fármacos para o tratamento das alterações fisiológicas na memória causadas pelo envelhecimento.

Desta forma, pode-se afirmar que os compostos quinolínicos apresentam diversas propriedades farmacológicas promissoras podendo auxiliar no tratamento de doenças neurodegenerativas relacionadas ao processo de estresse oxidativo. Sendo assim, diversos estudos continuam a ser realizados com o intuito de melhor compreender as ações farmacológicas destes compostos.

7-cloro-4-(fenilselanil)quinolina (4-PSQ)

Baseado nas diversas propriedades farmacológicas dos derivados quinolínicos e dos compostos orgânicos contendo selênio, o nosso grupo de pesquisa tem buscado elucidar as propriedades farmacológicas do 4-PSQ (Figura 8), um derivado de cloroquinolina com a presença de um átomo de selênio.

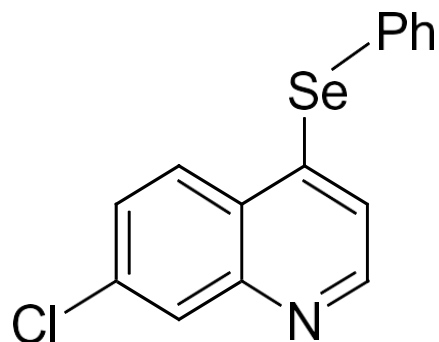


Figura 8. Estrutura química do 7-cloro-4-(fenilselanil)quinolina (4-PSQ)

O primeiro estudo mostrando as propriedades farmacológicas do 4-PSQ foi publicado em 2013 por Savegnago e colaboradores (2013). Neste estudo, os autores demonstraram que o 4-PSQ apresentou efeito antioxidante *in vitro*, por reduzir a capacidade redutora de íons férrico e inibir a peroxidação lipídica. Posteriormente, o efeito antioxidante deste composto *ex vivo* foi apresentado por Pinz e colaboradores (2016), onde os autores verificaram que o 4-PSQ reduziu os níveis de ERs induzidos por óleo de cróton na orelha dos camundongos. Além disso, no mesmo estudo, o composto, na dose de 25 mg/kg, protegeu parcialmente contra a diminuição dos níveis de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) e de 2,2-azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS), os quais são marcadores colorimétricos relacionados com a habilidade do composto em neutralizar radicais livres.

Mais recentemente, outros estudos também demonstraram o efeito antioxidante do 4-PSQ em modelos experimentais (SALGUEIRO et al; 2017; VOGT et. al 2018). No estudo de Vogt e colaboradores (2018), os autores verificaram que o composto, na dose de 10 mg/kg, reduziu o estresse oxidativo cerebral induzido pelo nitroprussiato de sódio em camundongos. Além disso, um importante achado demonstrou que o grupo fenilselanil presente na estrutura da quinolina é fundamental para a atividade antioxidante do 4-PSQ.

Salgueiro e colaboradores (2017) demonstraram que o 4-PSQ apresentou efeito antioxidante em um modelo *in vivo* de *Caenorhabditis elegans*. Os autores observaram que o 4-PSQ interagiu com proteínas tiólicas, que após a oxidação dos grupos sulfidril foi capaz de aumentar a expressão da superóxido dismutase-3 e da glutathione S-transferase-4, melhorando assim a resposta ao estresse oxidativo. Os resultados apresentaram uma nova visão sobre a modulação complexa de genes envolvidos no controle da resposta redox celular assim como das defesas antioxidantes endógenas, pelo 4-PSQ.

Outra propriedade farmacológica demonstrada pelo 4-PSQ foi o efeito antinociceptivo. O primeiro trabalho que demonstrou estas propriedades foi o estudo de Pinz e colaboradores (2016). Neste estudo, os autores verificaram que o 4-PSQ apresentou atividade antinociceptiva nos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, de nocicepção na placa quente e no teste da formalina. Importaneamente, o efeito antinociceptivo do composto foi rápido e duradouro. Os autores sugeriram que o 4-PSQ agiu em nível central e periférico (PINZ et al., 2016). Os mecanismos do efeito antinociceptivo do 4-PSQ foram evidenciados no estudo de Silva e colaboradores (2017). Os autores verificaram o envolvimento dos sistemas serotoninérgicos, nitrérgicos e glutamatérgicos na ação antinociceptiva aguda deste composto em camundongos no modelo de nocicepção induzida por ácido acético.

O efeito anti-inflamatório do 4-PSQ foi evidenciado em alguns estudos (PINZ et al., 2016; SILVA et al., 2017). Pinz e colaboradores (2016) verificaram que o composto reduziu o edema de pata e orelha induzidos por formalina e óleo de cróton, respectivamente. Além disso, uma redução na atividade da mieloperoxidase foi evidenciada nas orelhas dos camundongos tratados com o 4-PSQ. Importaneamente, os animais tratados com o 4-PSQ apresentaram resultados semelhantes àqueles observados no tratamento com o meloxicam, sendo este utilizado como um fármaco de referência.

Ampliando os estudos do efeito anti-inflamatório do 4-PSQ, Silva e colaboradores (2017) verificaram que o composto reduziu a migração celular, o acúmulo de exsudado pleural e a atividade da enzima mieloperoxidase induzida pela injeção de carragenina na cavidade pleural. Neste estudo, o composto também exerceu efeito antioxidante, reduzindo os níveis de espécies reativas e de tióis não-proteicos induzidos pela carragenina no lavado pleural (SILVA et al., 2017).

Ainda com o intuito de verificar o efeito anti-inflamatório do 4-PSQ, Voss e colaboradores (2018) avaliaram os efeitos do tratamento oral e tópico com o composto em um modelo de dermatite atópica induzida por 2,4-dinitroclorobenzeno (DNCB) em camundongos. O tratamento com o 4-PSQ foi capaz de atenuar as lesões cutâneas, o comportamento de coçar, o inchaço da orelha, o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase e os níveis de espécies reativas induzidos pela exposição ao DNBCB. Importaneamente, a eficácia do tratamento com o composto no modelo do tipo dermatite atópica foi semelhante ou até melhor do que a

dexametasona, um glicocorticóide frequentemente utilizados no tratamento da afecção.

Cabe mencionar que alguns estudos demonstraram o efeito do 4-PSQ em modelos de doenças que afetam o SNC. Neste contexto, o primeiro estudo publicado foi de Reis e colaboradores (2017). Onde os autores demonstraram que o composto apresentou ação do tipo-ansiolítica, tanto no teste da cruz elevada quanto no teste do claro-escuro quando induzidos por cainato (um agonista de receptor glutamatérgico). Neste estudo também foi demonstrado o envolvimento do sistema glutamatérgico no efeito do tipo-ansiolítico do composto, uma vez que o tratamento com o 4-PSQ reduziu a captação de [^3H] glutamato.

Ainda neste contexto de doenças relacionadas ao SNC, Pinz e colaboradores (2018) investigaram o efeito do 4-PSQ em um modelo de doença de Alzheimer em camundongos. Os autores verificaram que o 4-PSQ protegeu contra a ação ansiogênica, reforçando o trabalho publicado anteriormente, e o déficit de memória causados pelo peptídeo βA em camundongos. Além disso, demonstraram que o 4-PSQ comportou-se como uma molécula multi-alvo, pois protegeu contra o aumento na atividade da AChE e nos níveis de peroxidação lipídica nas estruturas cerebrais de camundongos causados pelo peptídeo βA .

Mais recentemente, Couto e colaboradores (2018) avaliaram os efeitos neuroprotetores do 4-PSQ, em um modelo de doença de Parkinson induzido por rotenona em *Drosophila melanogaster*. Nesse trabalho foi evidenciada a capacidade do 4-PSQ em prevenir o dano causado pela rotenona nos animais, e que o efeito protetor está relacionado com os níveis de selênio encontrados nas cabeças dessas moscas. Além disso, o efeito antioxidante do 4-PSQ está envolvido no efeito preventivo exercido pelo composto.

Em relação a toxicidade aguda em animais, alguns estudos demonstraram que o 4-PSQ não causou toxicidade renal e hepática por não alterar os marcadores de dano no rim e no fígado plasmáticos nas doses de 25 mg/kg (PINZ et al., 2016) e 50 mg/kg (REIS et al., 2017). Além disso, os parâmetros de estresse oxidativo cerebral e hepático não foram modificados em camundongos após o tratamento com o 4-PSQ (REIS et al., 2017). Ademais, PINZ e colaboradores (2018) mostraram que o tratamento sub-crônico com o 4-PSQ na dose de 1 mg/kg também não modificou os marcadores bioquímicos do plasma de dano renal e hepático. Entretanto, Salgueiro e colaboradores (2017) verificaram que o efeito toxicológico do 4-PSQ em

um modelo *in vivo* de *Caenorhabditis elegans* foi dependente da concentração usada. Foram esses resultados do composto 4-PSQ que motivaram a realização da presente tese.

4. Resultados

Os resultados que fazem parte dessa tese estão apresentados sob a forma de artigo e manuscrito. As seções materiais e métodos, resultados, discussão e referências encontram-se no próprio artigo e manuscrito e representam a íntegra desse estudo.

Os itens discussão e conclusões que se encontram no final dessa tese apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo e manuscrito contidos nesse trabalho.

As referências são referentes apenas às citações que aparecem nos itens introdução, revisão de literatura e discussão da tese.

Os artigos e os manuscritos estão estruturados de acordo com as revistas as quais foram publicados e submetidos.

MANUSCRITO 1

7-Chloro-4-(phenylselanyl) quinoline with memory enhancer actions in ageing rats: Modulation of neuroplasticity, acetylcholinesterase activity and cholesterol levels

Manuscrito aceito e publicado pela revista *Molecular Neurobiology*

ANEXO 1 – Autorização divulgação do artigo na tese



7-Chloro-4-(Phenylselanyl) Quinoline with Memory Enhancer Action in Aging Rats: Modulation of Neuroplasticity, Acetylcholinesterase Activity, and Cholesterol Levels

Anelise Barth¹ · Ane G. Vogt¹ · Angélica S. dos Reis¹ · Mikaela P. Pinz¹ · Roberta Krüger² · William B. Domingues³ · Diego Alves² · Vinicius F. Campos³ · Simone Pinton⁴ · Natália Paroul⁵ · Ethel A. Wilhelm^{1,6} · Cristiane Luchese^{1,6} 

Received: 23 October 2018 / Accepted: 15 February 2019
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

Abstract

This study investigated the effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) to restore the cognitive impairment caused by aging in male Wistar rats. Moreover, modulation of neuroplasticity markers, acetylcholinesterase (AChE) activity, and cholesterol levels was performed. Aged rats were intragastrically treated with 4-PSQ (5 mg/kg) for 7 days. Animals were tested in behavioral tasks, and then plasma (to determine cholesterol levels), hippocampus, and cerebral cortex (to determine neural cell adhesion molecule (NCAM) and polysialyltransferase (PST) levels, and AChE activity) were removed. Our findings demonstrated that treatment of aged rats with 4-PSQ restored short-term and long-term memories in the object recognition tests. 4-PSQ treatment did not restore exploratory activity (rearings) but partially restored locomotor activity (crossings) reduced by aging in the open-field test. Moreover, the compound restored the reduction in the NCAM and PST levels, and AChE activity in cerebral structures, as well as the increase in the plasma cholesterol levels, caused by aging in rats. In conclusion, 4-PSQ restored cognitive impairment caused by aging in rats by modulating synaptic plasticity, cholinergic system, and cholesterol levels.

Keywords Aging · Quinoline · Selenium · Memory · Learning · Plasticity

Introduction

Nowadays, the elderly are the fastest-growing segment of the population. This assumes an increase in life expectancy and a greater development of the aging process. This process occurs dynamically and progressively, and several changes determine

the individual's ability to adapt to the environment, causing greater vulnerability and a higher incidence of pathological processes [1, 2].

Neural networks are particularly vulnerable to aging. Aging impairs the functional integrity of neurons [3] associated with cognition and structural plasticity [4]. In fact, a

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12035-019-1530-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Ethel A. Wilhelm
ethelwilhelm@yahoo.com.br

✉ Cristiane Luchese
cristiane_luchese@yahoo.com.br

¹ Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Pesquisa em Farmacologia Bioquímica (LaFarBio), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Química, Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL), Universidade Federal de Pelotas, P.O. Box 354, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

³ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Laboratório de Genômica Estrutural, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

⁴ Laboratório de Bioquímica e Toxicologia de Eucariontes, Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, Uruguaiana, RS 97500-970, Brazil

⁵ Universidade Regional Integrada, Campus Erechim, Erechim, RS 99700-000, Brazil

⁶ Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Campus Capão do Leão, UFPel, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

reduction of structural and functional plasticity in brain regions, such as the hippocampus and the prefrontal cortex, causes a cognitive impairment, which is related to aging [5].

The neural cell adhesion molecule (NCAM) plays a key role in neural development and has been implicated in synaptic plasticity and cognitive processes in adulthood [6, 7]. Some studies showed that a decrease of NCAM expression was associated with poor performance in spatial learning and memory tasks, as well as reduced levels of polysialylated neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in the hippocampus and prefrontal cortex of aging rodents [8].

Additionally, some authors show that a deficit of cognition is caused, at least in part, by damage to cholinergic projections from the basal forebrain to the cortex [9, 10]. One of the most ubiquitous enzymes present in the cholinergic synapses is acetylcholinesterase (AChE) [11]. Janeczek et al. [12] inferred that a decrease in AChE activity in normal elderly people reflects the neuroplasticity that optimizes the capacity of memory by the impact of presynaptically released acetylcholine.

Moreover, an increase in the risk of developing neurodegenerative diseases, including dementia and Alzheimer's disease, has been associated with aging [13]. Along these lines, abnormalities in cholesterol metabolism are important in the pathogenesis of Alzheimer's disease, which contribute to cognitive decline among the aged [14].

In this context, the pharmaceutical industry has developed therapeutic strategies to minimize or even slow down the effects of aging on the human brain, promoting an improvement in quality and life expectancy [15, 16]. Selenium is a trace element, which significantly influences the cognitive functions [17] and different neurological disorders [18]. As an alternative to incorporate selenium into organic molecules, synthetic approaches have been developed for the synthesis of various organoselenium derivatives. Organoselenium compounds had an effect in improving memory and learning processes in adult [19] and old [20–22] animals.

7-Chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) is an organoselenium compound and a quinoline derivative, which has several pharmacological properties already described in the literature [23–30]. Thus, quinoline derivatives have received the attention of researchers because of their important pharmacological actions [31, 32].

Based on the aforementioned facts and on our interest in applying the findings of the pharmacology of 4-PSQ, the purpose of the present study was to investigate the possible effect of 4-PSQ in the treatment of the cognitive impairment caused by aging in rats. In addition, we examined the effect of the compound on the expression of NCAM and two polysialyltransferases (STX and PST) involved in the neuroplasticity and in the AChE activity in the hippocampus and cerebral cortex, as well as plasma cholesterol levels of aged rats.

Material and Methods

Animals

Male young adult (3 months old, 10% lifespan completed, weighing 170–250 g) and aged (23 months old, 76.6% lifespan completed, weighing 400–700 g) Wistar rats were obtained from a local breeding colony. The animals were housed in cages with free access to food and water. They were kept in a separate air-conditioned (22 ± 2 °C) room, on a 12-h light/12-h dark cycle, with lights on at 7:00 a.m. Commercial diet and water were supplied *ad libitum*. Animal care and all experimental procedures were conducted in compliance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications no. 80-23, revised in 1996) [33] and in accordance with the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Pelotas, Brazil (CEEAA 4599-2016). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Drugs

4-PSQ (Fig. 1) was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described by Duarte et al. [25]. Analysis of the ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of 4-PSQ (99.9%) was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS). The compound was dissolved in canola oil. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

Experimental Protocol

Rats were randomly divided into three experimental groups (10 animals/group) (Table 1). The animals belonging to young adult and aged groups received the canola oil (1 ml/kg) and the animals of the aged + 4-PSQ group received the compound (5 mg/kg). Treatments with canola oil or 4-PSQ were performed for 7 days, daily, by intragastric (i.g.) route, via

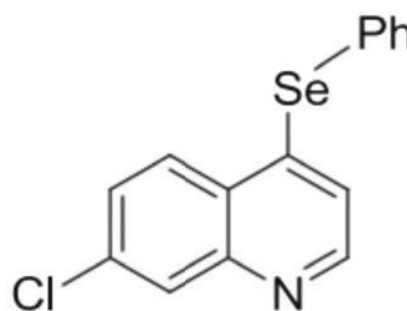


Fig. 1 Chemical structure of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ)

Table 1 Experimental groups

Group	Treatment
Young adult	Canola oil (1 ml/kg, i.g.)
Aged	Canola oil (1 ml/kg, i.g.)
Aged + 4-PSQ	4-PSQ (5 mg/kg, i.g.)

The animals were intragastrically (i.g.) treated with 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) or canola oil, daily, for 7 days. The number of rats tested was 10/group

gavage. The 4-PSQ dose was chosen based on previous studies by our group [24, 30].

Figure 2 illustrates the experimental protocol of this study. After 7 days of treatment, animals were tested in behavioral tasks: the open-field (OFT) and object recognition (ORT) tests. Subsequent to behavioral tests, animals were allowed to rest until the 14th day in order to avoid behavioral stress, when they were euthanized by inhalation of isoflurane for ex vivo assays. The experimental protocol agreed with Bortolatto et al. [20].

Behavioral Tasks

OFT

The OFT was performed on the 7th day of the experimental protocol. The open field was a 40 × 45-cm arena surrounded by 50-cm-high plywood walls. The floor of the open field was divided into 9 equal squares (3 × 3). Each animal was placed at the center of the open field and observed for 4 min to record the locomotor (number of segments crossed with the four paws) and exploratory (number of rearings on the hind limbs) activities [34]. The arena floor was cleaned between experiments and the test was carried out in a temperature- and light-controlled room. The 4-min session of OFT was also useful to familiarize the rats with the arena, as a context habituation trial for the recognition memory task.

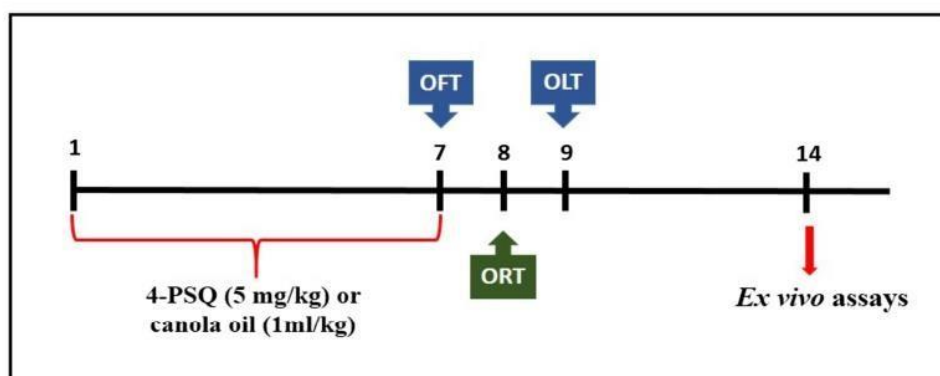
ORT

Twenty-four hours after OFT (on the 8th day of the experimental protocol), animals were trained in the same arena in order to perform a novel ORT as previously described [35]. ORT, a non-spatial memory task, is used as a measure to evaluate the short-term (STM) and long-term (LTM) memories. Four objects were used in this task: A₁, A₂, B, and C. The A₁ and A₂ objects were two identical balls, the B object was a cube and the C object was a square. Each object presented the following color pattern: blue, red, and yellow. All objects were made of plastic material, measuring 10 × 10 cm (length × height). On the day of the task, training was conducted by placing individual rats in the center of the arena, in which two identical objects (objects A₁ and A₂) were positioned in two adjacent corners, slightly away from the walls. Animals were allowed to explore the objects for 5 min. Exploration was defined as sniffing or touching the object with the nose and/or forepaws. Periods in which the rat moved around, climbed over, or sat on the objects were not recorded. The STM of rats was evaluated 1.5 h after training in the presence of a familiar object (A₁) and a novel object (B), and the total time spent in exploring each object was determined during 5 min as a measure of learning and recognition memory. After STM, the rats were housed in our boxes. The LTM was performed 24 h after training, on the 9th day of the experimental protocol, in which rats were placed to explore a familiar object (A₁) and a novel object (C) for 5 min and the total time spent in exploring each object was determined. To prevent olfactory cues, the objects and the field were cleaned with an ethanol/water solution after each trial. The results were expressed as exploratory preference (%) according to the following formula: $[\text{time spent on the novel object} / (\text{time spent on the familiar object} + \text{time spent on the novel object})] \times 100$.

Ex Vivo Assays

On the 14th day of the experimental protocol, rats were anesthetized with isoflurane and blood samples were collected

Fig. 2 The experimental protocol. Aged rats were intragastrically (i.g.) treated for 7 days with 4-PSQ (5 mg/kg) or canola oil (1 ml/kg). Young adult animals received the canola oil (1 ml/kg). Open-field test (OFT) and object recognition test (ORT) were performed on the 7th, 8th, and 9th days, respectively. On the 14th day, the animals were euthanized by inhalation of isoflurane for ex vivo assays



from the heart ventricle, using heparin as anticoagulant to obtain plasma. Plasma was obtained by centrifugation ($900\times g$ for 15 min) to determine the cholesterol levels.

Cerebral structures (cortex and hippocampus) were immediately removed and dissected. The cerebral cortex and hippocampus were separated and washed with cold saline solution (0.9%) to determine AChE activity and expression of NCAM, STX, and PST.

AChE Activity

Cerebral cortex and hippocampus samples were homogenized in 0.25 M sucrose buffer (1/10, weight/volume) and centrifuged at $900\times g$ at 4 °C for 15 min. AChE activity was performed according to the method of Ellman et al. [36], using acetylthiocholine as substrate. Enzyme activity was measured by spectrophotometry at 412 nm and expressed as micromole of acetylcholine (ACh) per hour per milligram of protein. The protein concentration was measured according to the Bradford method [37].

Expression of NCAM, STX, and PST

RNA Extraction, cDNA Synthesis, and Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Total mRNA was extracted in the hippocampus and cerebral cortex using TRIzol reagent (Invitrogen™, Carlsbad, USA) followed by DNase treatment with DNase I Amplification Grade (Invitrogen™, Carlsbad, USA) in order to ensure minimum DNA contamination of the samples. The total RNA isolated was quantified and its purity (260/280 and 260/230 ratios) was examined by the spectrophotometer NanoVue (GE, Fairfield, CT, USA). The cDNA synthesis was performed using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (AppliedBiosystems™, UK) according to the manufacturer's protocol. For reverse transcription, 1 µg of total RNA was used in a reaction volume of 20 µl. The amplification was performed with GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI) using the Agilent Mx3005P QPCR System (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) and the sequence of primers used is indicated in Table 2. The qPCR conditions were as follows: 10 min at 95 °C to activate the hot-start Taq polymerase, followed by 35 cycles of denaturation for 15 s at 95 °C, primer annealing for 60 s at 60 °C, and extension for 30 s at 72 °C (fluorescence signals were detected at the end of every cycle). Baseline and threshold values were automatically set by the Stratagene MxPro software. The number of PCR cycles required to reach the fluorescence threshold in each sample was defined as the cycle threshold (Ct) value, and each sample was analyzed in duplicate to obtain an average Ct for each sample. The $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method was used to normalize the fold change in gene expressions, using the beta-actin (ACTB) as housekeeping gene.

Table 2 Primers used for quantitative real-time polymerase chain reaction

Primer name	Sequence
NCAM forward	GGAGTTCCCATCCTCAAATACAA
NCAM reverse	TACCACTTGAATGCCATGCT
STX forward	CAACTCAGGAGTCTTGCTCAACA
STX reverse	CCGGGCATACTCCTGAAGCTG
PST forward	CAGGACTGAGGAGCACCAAGA
PST reverse	TGTGTCATATCCTGAACATGCATT
ACTB forward	AAGTCCCTCACCTCCCAAAAG
ACTB reverse	AAGCAATGCTGTACCTTCCC

The forward and reverse primer sequences used to amplify each target gene as well as the ACTB endogenous control are listed

Cholesterol Levels

The cholesterol levels were determined in the plasma of rats using an automated kinetic colorimetric method by Cobas Integra 400 plus. Cholesterol esters are cleaved by the action of cholesterol esterase and produce free cholesterol and fatty acids. Cholesterol oxidase catalyzes the oxidation of cholesterol to cholest-4-en-3-one and hydrogen. In the presence of peroxidase, the hydrogen peroxide formed affects the oxidative coupling of phenol and 4-aminoantipyrine, forming a quinone-imine red dye. The color intensity of the dye formed is directly proportional to the concentration of cholesterol. It is determined by measuring the increase in absorbance at 512 nm.

Statistical Analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). Data were analyzed by Graphpad Prism® 5; the normality of data was evaluated by the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Statistical analysis was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test when appropriate. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The Pearson correlation coefficient was used for correlation analysis.

Results

OFT

The number of rearings and crossings in the OFT is presented in Fig. 3a and b, respectively. The one-way ANOVA revealed a significant difference in the number of rearings ($F_{(2,27)} = 10.09$, $p < 0.001$) and crossings ($F_{(2,27)} = 30.40$, $p < 0.0001$) of rats. Aged rats had a reduction in the number of rearings

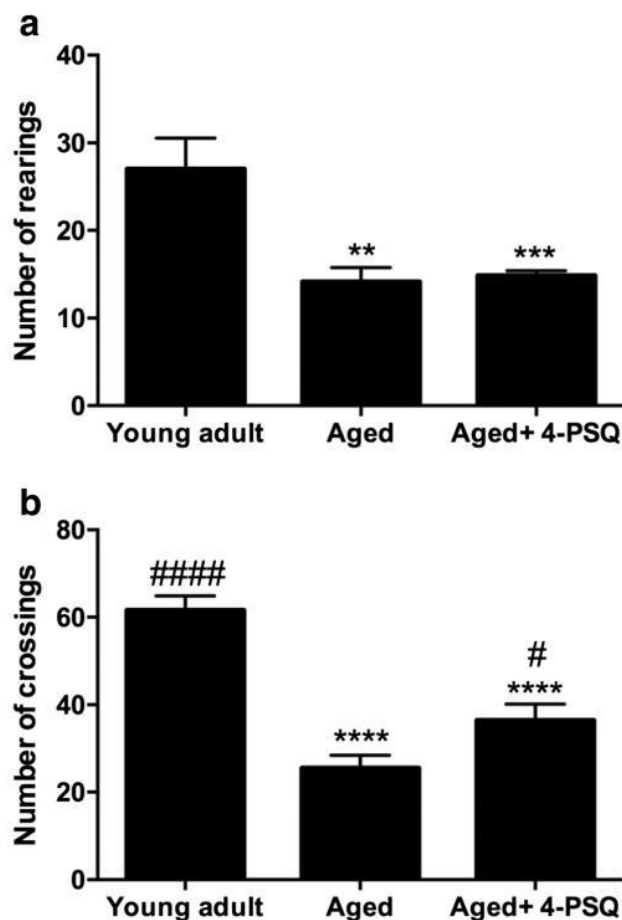


Fig. 3 Effect of 4-PSQ treatment on the exploratory (a) and locomotor (b) behaviors of rats in the open-field test (OFT). Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean ($n = 10$ rats/group). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ as compared with the young adult group. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ as compared with the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

(around 58%) (Fig. 3a) and crossings (around 48%) (Fig. 3b), when compared with the young adult rats. Treatment with 4-PSQ was not effective in reversing the number of rearings (Fig. 3a), but it partially restored the number of crossings (Fig. 3b).

ORT

There was no significant difference among groups in the percentage of exploratory preference during the familiarization phase ($F_{(2,27)} = 1.576$, $p > 0.05$) (data not shown).

In STM, the one-way ANOVA revealed a significant effect on the percentage of exploratory preference for a novel object in rats ($F_{(2,27)} = 11.61$, $p < 0.001$). Aged rats had a reduction (around 43%) in the exploratory preference for the new object, when compared with young adult rats (Fig. 4a). The treatment of aged rats with 4-PSQ reversed this memory parameter in aged rats, reaching the levels of young adult rats (Fig. 4a).

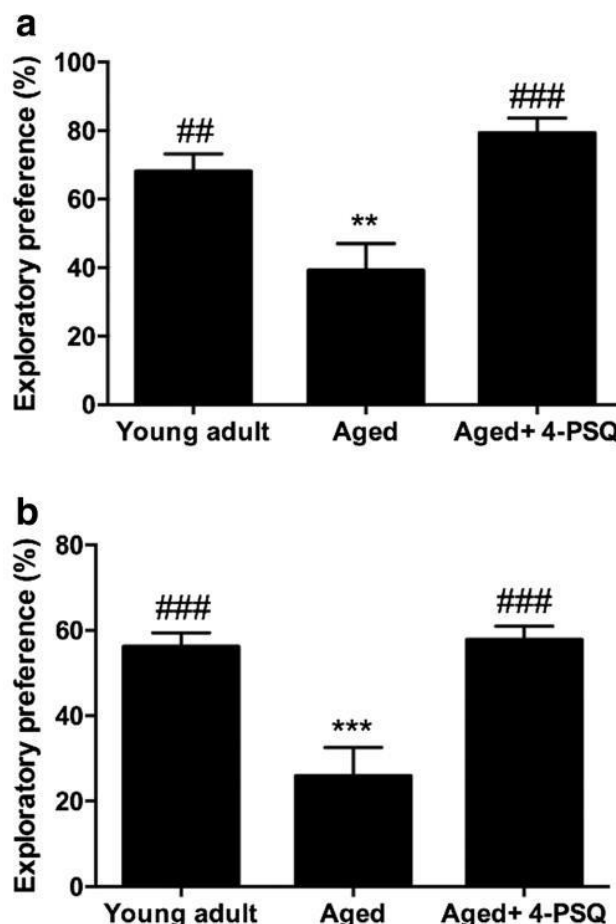


Fig. 4 Effect of 4-PSQ treatment on short-term (a) and long-term (b) memories in the object recognition test (ORT). Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean ($n = 10$ rats/group). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ as compared with the young adult group. # $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ as compared with the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

In LTM, the one-way ANOVA had a significant effect on the exploratory preference percentage for a novel object in rats ($F_{(2,27)} = 14.61$, $p < 0.0001$). Statistical analysis showed that the exploratory preference was reduced (around 54%) in the aged rats, when compared with the young adult rats (Fig. 4b). 4-PSQ treatment enhanced the percentage of preference for a novel object in aged rats, reaching values similar to those of young adult rats (Fig. 4b).

AChE Activity

The one-way ANOVA showed a significant difference in the AChE activity in the rat cerebral cortex ($F_{(2,27)} = 6.102$, $p < 0.01$) and hippocampus ($F_{(2,27)} = 5.371$, $p < 0.05$). The enzymatic activity was reduced in both brain structures of aged rats (around 40% for the cerebral cortex and 28% for the hippocampus), when compared with the young adult rats (Fig. 5a and b, respectively). Treatment with 4-PSQ was

effective to reverse the inhibition on the AChE activity in the cerebral cortex (Fig. 5a) and hippocampus (Fig. 5b) of aged rats.

The correlation analysis (Pearson's correlation coefficient) revealed a positive correlation between the AChE activity in both cerebral structures and STM ($r = 0.533$; $p < 0.05$ for the cerebral cortex and $r = 0.527$; $p < 0.05$ for the hippocampus). Moreover, the correlation analysis (Pearson's correlation coefficient) demonstrated a positive correlation between the AChE activity in both cerebral structures and LTM ($r = 0.478$; $p < 0.05$ for the cerebral cortex and $r = 0.527$; $p < 0.05$ for the hippocampus).

Expression of NCAM, STX, and PST

The one-way ANOVA of NCAM expression revealed significant changes in the cerebral cortex ($F_{(2,18)} = 5.256$, $p < 0.05$)

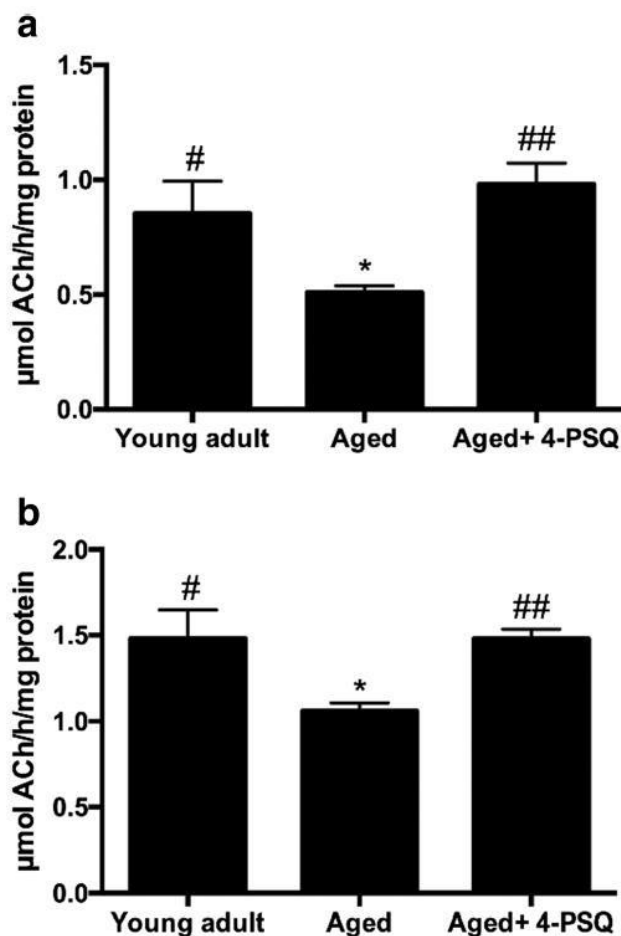


Fig. 5 Effect of 4-PSQ treatment on the acetylcholinesterase (AChE) activity in the cerebral cortex (a) and hippocampus (b) of rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean ($n = 10$ rats/group). * $p < 0.05$ as compared with the young adult group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ as compared with the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

and hippocampus ($F_{(2,18)} = 11.26$, $p < 0.001$) of rats. Aged rats had a reduction in cerebral cortex and hippocampus NCAM expression (around 24 and 14%, respectively) compared with young adult rats (Fig. 6a and b, respectively). Treatment of aged rats with 4-PSQ reversed the reduction of NCAM expression in both cerebral structures (Fig. 6a and b).

The one-way ANOVA of PST expression showed a significant difference in the cerebral cortex ($F_{(2,18)} = 11.25$, $p < 0.001$) and hippocampus ($F_{(2,18)} = 5.554$, $p < 0.05$) of rats. PST expression was reduced in both cerebral structures (around 32% for the cerebral cortex and 54% for the hippocampus) of aged rats, when compared with the young adult rats (Fig. 7a and b). 4-PSQ treatment was effective to restore the reduction of the PST expression in the cerebral cortex (Fig. 7a) and hippocampus (Fig. 7b) of aged rats.

The one-way ANOVA demonstrated changes in STX expression in the cerebral cortex ($F_{(2,18)} = 6.000$, $p < 0.05$), but there was no alteration in the hippocampus ($F_{(2,18)} = 0.6449$, $p > 0.05$) of rats. STX expression did not change in the

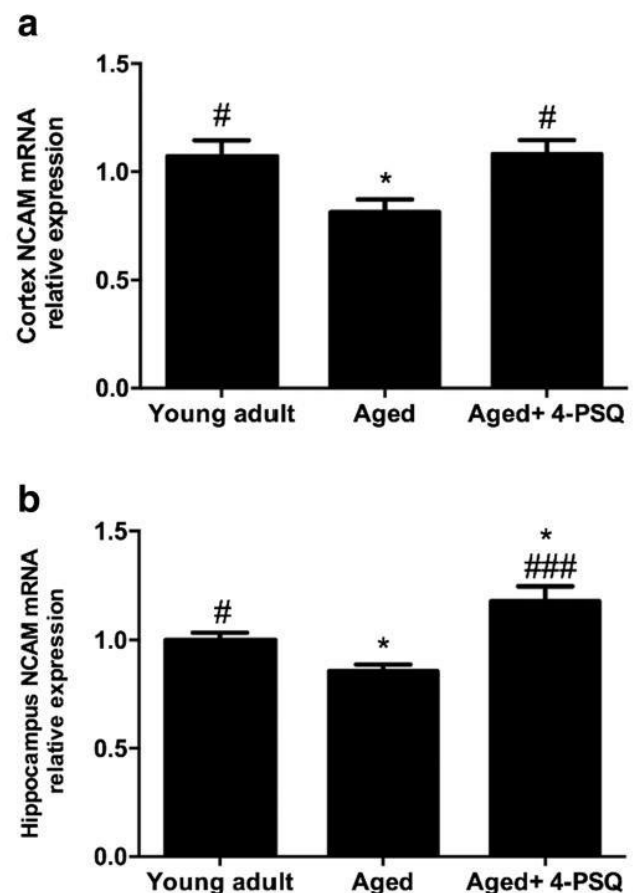


Fig. 6 Effect of 4-PSQ treatment on the neural cell adhesion molecule (NCAM) levels in the cerebral cortex (a) and hippocampus (b) of rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean ($n = 7$ rats/group). * $p < 0.05$ as compared with the young adult group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ as compared with the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

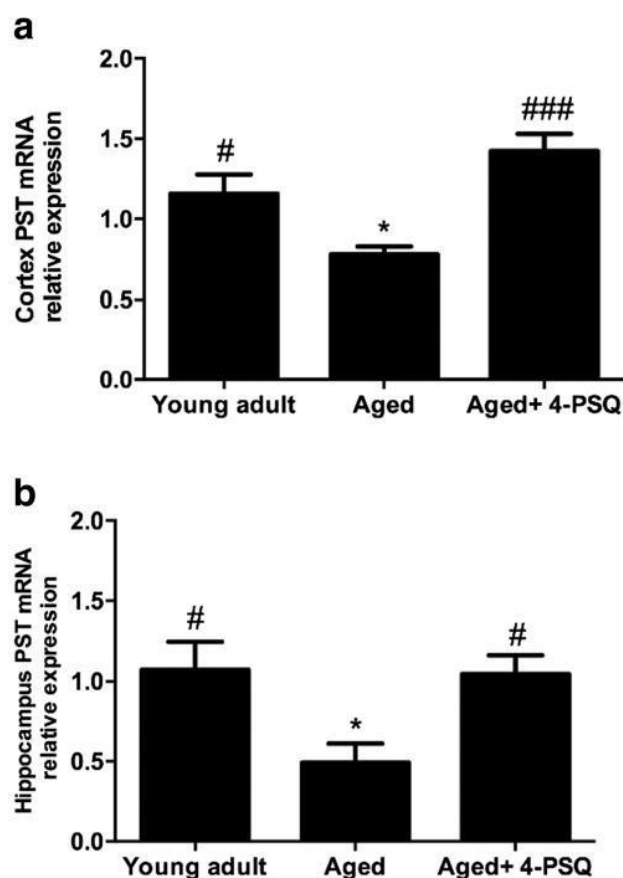


Fig. 7 Effect of 4-PSQ treatment on the polysialyltransferase PST levels in the cerebral cortex (a) and hippocampus (b) of rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean ($n = 7$ rats/group). * $p < 0.05$ as compared with the young adult group. # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ as compared with the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

cerebral cortex and hippocampus of aged rats compared with young adult rats (Fig. 8a and b, respectively). The treatment of aged rats with 4-PSQ increased (around 45%) the STX expression in the cerebral cortex, when compared with aged and young adult rats (Fig. 8a), but there was no alteration in the hippocampus (Fig. 8b).

Cholesterol Levels

The one-way ANOVA revealed a significant difference in cholesterol levels in the plasma of rats ($F_{(2,18)} = 6.249$, $p < 0.01$). Cholesterol levels increased (around 54%) in the plasma of aged rats and treatment with 4-PSQ was effective to restore this biochemical marker (Fig. 9).

Discussion

In the present study, we provided evidence for the effect of 4-PSQ on the age-related cognitive impairment in rats. These

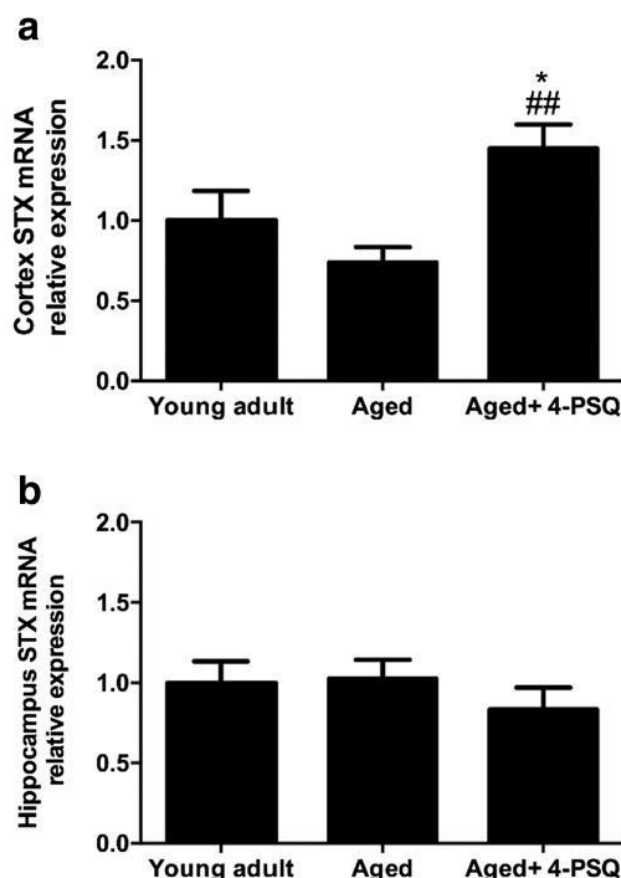


Fig. 8 Effect of 4-PSQ treatment on the polysialyltransferase STX levels in the cerebral cortex (a) and hippocampus (b) of rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean ($n = 7$ rats/group). * $p < 0.05$ as compared with the young adult group. ## $p < 0.01$ as compared with the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

results are strongly related to the improvement of synaptic plasticity, cholinergic system, and cholesterol levels of aged rats. Moreover, this study also demonstrated the influence of age on locomotor and exploratory activities.

Aging is associated with a decline in cognitive function, including learning and memory [38]. In the current study, we analyzed recognition memory by ORT, a non-spatial memory type based on the natural tendency of rodents to explore novel objects, which mainly relies on the function of the perirhinal cortex and hippocampus [39]. Our results demonstrated that aged rats had an age-related deficit in STM and LTM, as evidenced in ORT.

The most important finding of this study was that treatment with 4-PSQ restored cognitive deficits impaired by age in rats, enhancing STM, LTM, and spatial memory, since it caused an increase of the exploratory preference by the novel object and by location of the object in aging rats. The compound investigated in this study, 4-PSQ, is a quinoline derivative with an organoselenium substituent. Indeed, quinoline compounds have been widely studied and have presented promising

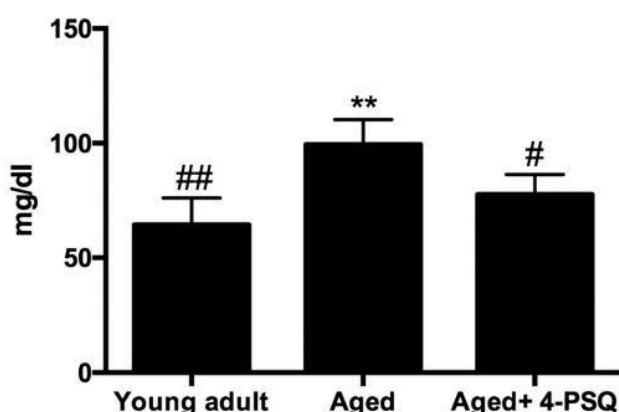


Fig. 9 Effect of 4-PSQ treatment on the plasma cholesterol levels of rats. Values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean ($n = 7$ rats/group). ** $p < 0.01$ as compared with the young adult group. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ as compared with the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test)

biological activities, being found in pharmacologically active natural products, and extensively used in clinical practice [40]. In addition, it is known that the selenium status decreases with age and may contribute to impairment of neuropsychological functions [41], such as cognitive functions [17]. Thus, incorporating selenium into organic molecules is a good alternative to supplement with this element. In this context, studies have demonstrated that organoselenium compounds are good alternatives to improve the cognitive deficit caused by aging in rats [42]. Therefore, 4-PSQ is a promising molecule, since it combines the properties of quinoline derivatives with organic selenium compounds. In fact, our research group has demonstrated a significant number of pharmacological properties of this compound, such as being antioxidant, antinociceptive, anti-inflammatory, and anxiolytic-like [24, 26, 28–30].

In addition, the possibility of a biological and/or clinical connection between movement, cognition, and emotion has been investigated in the aging process [43]. In the present study, crossing and rearing behaviors of aged rats in the OFT were reduced compared with young adult rats, indicating that advanced age could cause an impairment in the locomotor and exploratory activities of the animals. Indeed, studies have shown that aging causes a reduction in these behaviors [20, 42]. Treatment with 4-PSQ for 7 days did not protect against the impairment in the locomotor and exploratory activities caused by aging. In accordance, other studies have shown the failure in the treatment of locomotor and exploratory disorders in aged rats [20, 42].

Cognitive processes, mediated through the hippocampus and the prefrontal cortex, are affected by aging [3, 5]. In the present study, we measured the AChE activity in the cerebral cortex and hippocampus of aged rats in an attempt to relate cognitive functions to the cholinergic system. Here, a decline in the AChE activity in aged rats as compared with the young adult rats was observed in both regions of the brain. In fact, a

reduction on the AChE activity is an important marker of age-related cholinergic neurotransmission dysfunction. The central cholinergic system is constituted by neurotransmitter acetylcholine, which is involved in the regulation of cognitive functions [44]. In this way, studies have shown that a decrease of AChE activity by aging is due to acetylcholine content in the brain, since acetylcholine synthesis and release are diminished in aged animals [45]. Moreover, Richter et al. [46] in 2017 showed a negative correlation between older people and AChE activity.

Hence, the cholinergic system might be recommended as a cognitive dysfunction treatment strategy target [47]. Importantly, in the current study, treatment with 4-PSQ reversed the inhibition of AChE activity in both cerebral structures caused by aging. This finding suggests that an increase in AChE activity caused by 4-PSQ might be related to improvement obtained in behavioral tests and it is useful in the treatment of age-related memory impairments.

Evidences indicated that age-related cognitive decline is more likely associated with alterations in synaptic connectivity than with neuronal loss [3, 48]. In this sense, NCAMs have played a key role in neural development and have been implicated in synaptic plasticity and cognitive and emotional processes in adulthood [6, 7]. In the present investigation, our objective was verified whether 4-PSQ alleviates age-induced alterations in NCAMs. The aging process significantly decreases NCAM mRNA expression in the cerebral cortex and hippocampus of rats. These results are in accordance with those obtained in the behavioral tests, given that the memory of aged rats was impaired. Indeed, the literature suggests that NCAMs are indispensable for the formation and consolidation of learning and memory [7]. Treatment with 4-PSQ significantly enhanced NCAM levels in the cerebral cortex and hippocampus of aged rats, suggesting that this compound could reverse the inhibition of the transcription and translation of NCAMs induced by aging. Few studies have demonstrated the effect of organoselenium compounds on the expression of NCAMs. Wang et al. [49] showed that an organoselenium compound, selenomethionine, reversed the changes of NCAMs induced by lead.

In addition, aging reduced the mRNA levels of PST in the hippocampus and cerebral cortex of rats as compared with the young adult rats; however, no change was found in the mRNA levels of STX in both cerebral structures. PST (or ST8SiaIV) and STX (or ST8SiaII) are polysialyltransferases responsible for synthesizing α -2,8-polysialic acid and adding it to the extracellular domains of NCAM [50, 51]. During embryonic development and the early postnatal period, NCAM is heavily polysialylated (PSA-NCAM) and STX is dominant in these periods [52]. In adulthood, PSA-NCAM is restricted to specific regions of the brain, such as the hippocampus and cerebral cortex, which have roles in synaptic plasticity and general cell migration, PST being the main one associated with α -2,8-polysialylation in the postnatal brain [52, 53]. Our results suggested that aging downregulated PST mRNA in the

hippocampus and cerebral cortex of rats, this being mainly found in the old ones, reducing polysialylation of NCAM, and decreasing synaptic plasticity in these cerebral regions. Importantly, treatment with 4-PSQ significantly enhanced PST levels in both cerebral structures of aged rats, and it upregulated STX levels in the cerebral cortex. These results indicated that 4-PSQ restored polysialyltransferases, mainly PST, increasing polysialylation of NCAM, restoring synaptic plasticity in cerebral structures of aged rats, improving the cognitive functions in the behavioral tasks.

In an attempt to explain the other mechanisms involved in 4-PSQ effects in the aged rats, cholesterol was measured since it plays an important role in maintaining the function of the central nervous system. In the present study, aged rats had an increase in the plasma cholesterol levels, when compared with young adult rats. Indeed, high cholesterol levels have detrimental effects on cognitive performance in animal models [54]. Additionally, there is an association between Alzheimer's disease and cholesterol levels, potentially by increasing the neuronal content of cholesterol, promoting cleavage of the amyloid protein precursor, and an impaired working memory [55], affecting directly the neurodegeneration [56]. Several studies on humans investigated a relation between plasma lipids and dementia, showing that elderly people with neurodegenerative disease, such as Alzheimer's disease, or dementia, and cognitive deficits have higher plasma total cholesterol [57]. Our results verified that 4-PSQ was able to restore the cholesterol levels in aged rats. Indeed, clinical studies suggested that statins might reduce the risk and progression of cognitive deficit in Alzheimer's disease [58]. Therefore, the hypocholesterolemic effect of 4-PSQ is beneficial to restore the cognitive impairment caused by aging.

Conclusions

In conclusion, our findings demonstrated that 4-PSQ restored the cognitive impairment caused by aging in rats. In addition, the compound modulated the synaptic plasticity, cholinergic system, and cholesterol levels of aged rats. Thus, these results strongly contribute to the research of a novel therapeutic agent for geriatric memory deficit.

Funding Information This study received financial support and scholarships from the following Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (UNIVERSAL 408874/2016-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (PRONEM 16/2551-0000240-1, PRONUPEQ 16/2551-0000526-5, PqG 17/2551-0001013-2). This study was also financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) - Finance Code 001. A.G.V. is the recipient of a FAPERGS fellowship. D.A., V.F.C., E.A.W., and C. L. are recipients of CNPq fellowship. This study also received financial assistance from L'ORÉAL-UNESCO-ABC for Women in Science.

Compliance with Ethical Standards

Animal care and all experimental procedures were conducted in compliance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications no. 80-23, revised in 1996) [33] and in accordance with the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Pelotas, Brazil (CEEa 4599-2016). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

1. Antoniou M, Wright S (2017) Uncovering the mechanisms responsible for why language learning may promote healthy cognitive aging. *Front Psychol* 8:2217
2. Drachman DA (2006) Aging of the brain and Alzheimer's disease. *Neurology* 67:1340–1352
3. Morrison JH, Baxter MG (2012) The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci* 13:240–250
4. Bloss EK, Janssen WG, Ohm DT, Yuk FJ, Wadsworth S, Saardi KM, McEwen BS, Morrison JH (2011) Evidence for reduced experience-dependent dendritic spine plasticity in the aging prefrontal cortex. *J Neurosci* 31:7831–7839
5. Driscoll I, Howard SR, Stone JC, Monfils MH, Tomanek B, Brooks WM, Sutherland RJ (2006) The aging hippocampus: a multi-level analysis in the rat. *Neurosci* 139:1173–1185
6. Conboy L, Bisak R, Markram K, Sandi C (2010) Role of NCAM in emotion and learning. *Adv Exp Med Biol* 663:271–296
7. Muller D, Mendez P, Deroo M, Klausner P, Steen S, Poglia L (2010) Role of NCAM in spine dynamics and synaptogenesis. *Adv Exp Med Biol* 663:245–256
8. Varea E, Castillo-Gomez E, Gomez-Climent MA, Guirado R, Blasco-Ibanez JM, Crespo C, Martinez-Guijarro FJ, Nacher J (2009) Differential evolution of PSA-NCAM expression during aging of the rat telencephalon. *Neurobiol Aging* 30:808–818
9. Pratt RD, Perdomo CA (2002) Donepezil-treated patients with probable vascular dementia demonstrate cognitive benefits. *Ann N Y Acad Sci* 977:513–522
10. Bohnen NI, Muller ML, Kuwabara H, Constantine GM, Studenski AS (2009) Age-associated leukoaraiosis and cortical cholinergic deafferentation. *Neurology* 72:1411–1416
11. Koenigsberger C, Chiappa S, Brimijoin S (1997) Neurite differentiation is modulated in neuroblastoma cells engineered for altered acetylcholinesterase expression. *J Neurochem* 69:1389–1397
12. Janeczek M, Gefen T, Samimi M, Kim G, Weintraub S, Bigio E, Rogalski M, Mesulam M et al (2018) Variations in acetylcholinesterase activity within human cortical pyramidal neurons across age and cognitive trajectories. *Cereb Cortex* 28:1329–1337
13. Mendez MF (2017) Early-onset Alzheimer disease. *Neurol Clin* 35(2):263–281
14. Martins IJ, Berger T, Sharman MJ, Verdile G, Fuller SJ, Martins RN (2009) Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem* 111:1275–1308
15. Aisen PS, Cummings J, Jack CR et al (2017) On the path to 2025: understanding the Alzheimer's disease continuum. *Alzheimers Res Ther* 9:5
16. Majkutewicz I, Kurowska E, Podlacha M, Myślińska D, Grembecka B, Ruciński J, Pierzynowska K, Wrona D (2018)

- Age-dependent effects of dimethyl fumarate on cognitive and neuropathological features in the streptozotocin-induced rat model of Alzheimer's disease. *Brain Res* 1686:19–33
17. Rayman MP (2012) Selenium and human health. *Lancet* 379:1256–1268
 18. Dominiak A, Wilkaniec A, Wroczynski P, Adamczyk A (2016) Selenium in the therapy of neurological diseases. Where is it going? *Curr Neuroparmacol* 14:282–299
 19. Wilhelm EA, Souza AC, Gai BM, Chagas PM, Roehrs JA, Nogueira CW (2012) Hyperthermic seizures enhance responsiveness to pentylenetetrazole and induce cognitive dysfunction: protective effect of 3-alkynyl selenophene. *Life Sci* 90:666–672
 20. Bortolatto CF, Wilhelm EA, Chagas PM, Nogueira CW (2012) p-Chloro-diphenyl diselenide, an organoselenium compound, with antidepressant-like and memory enhancer actions in aging male rats. *Biogerontology* 13:237–249
 21. Bortolatto CF, Guerra Souza AC, Wilhelm EA, Nogueira CW (2013) Acute treatment with bis selenide, an organic compound containing the trace element selenium, prevents memory deficits induced by reserpine in rats. *Biol Trace Elem Res* 151:92–99
 22. Jardim NS, Sartori G, Sari MHM, Müller SG, Nogueira CW (2017) Bisphenol A impairs the memory function and glutamatergic homeostasis in a sex-dependent manner in mice: beneficial effects of diphenyl diselenide. *J Biol Inorg Chem* 329:75–84
 23. Savegnago L, Vieira AI, Seus N, Goldani BS, Castro MR, Lenardão EJ, Alves D (2013) Synthesis and antioxidant properties of novel quinoline–chalcogenium compounds. *Tetrahedron Lett* 54:40–44
 24. Pinz M, Reis AS, Duarte V, da Rocha MJ, Goldani BS, Alves D, Savegnago L, Luchese C et al (2016) 4-Phenylselenenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. *Eur J Pharmacol* 780:122–128
 25. Duarte LFB, Oliveira RL, Rodrigues KC, Voss GT, Godoi B, Schumacher RF, Perin G, Wilhelm EA et al (2017) Organoselenium compounds from purines: synthesis of 6-arylselenylpurines with antioxidant and anticholinesterase activities and memory improvement effect. *Bioorg Med Chem* 25:6718–6723
 26. Reis AS, Pinz M, Duarte LFB, Roehrs JA, Alves D, Luchese C, Wilhelm EA (2017) 4-Phenylselenenyl-7-chloroquinoline, a novel multitarget compound with anxiolytic activity: contribution of the glutamatergic system. *J Psychiatr Res* 84:191–199
 27. Salgueiro WG, Goldani BS, Peres TV, Miranda-Vizuete A, Aschner M, Rocha JBT, Alves D, De Ávila DS (2017) Insights into the differential toxicological and antioxidant effects of 4-phenylchalcogenyl-7-chloroquinolines in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* 110:133–141
 28. Silva VDG, Reis AS, Pinz MP, da Fonseca CAR, Duarte LFB, Roehrs JA, Alves D, Luchese C et al (2017) Further analysis of acute antinociceptive and anti-inflammatory actions of 4-phenylselenenyl-7-chloroquinoline in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 31:513–525
 29. Vogt AG, Voss GT, de Oliveira RL, Paltian JJ, Duarte LFB, Alves D, Jesse CR, Roman SS et al (2018) Organoselenium group is critical for antioxidant activity of 7-chloro-4-phenylselenenyl-quinoline. *Chem Biol Interact* 282:7–12
 30. Voss GT, Oliveira RL, De Souza JF, Duarte LFB, Fajardo AR, Alves D, Luchese C, Wilhelm EA (2018) Therapeutic and technological potential of 7-chloro-4-phenylselenenyl quinoline for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 84:90–98
 31. Wilhelm EA, Machado NC, Pedroso AB, Goldani BS, Seus N, Moura N, Savegnago L, Jacob RG et al (2014) Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3-triazolyl carboxamides as potential antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent. *RSC Adv* 4:41437–41445
 32. Saraiva MT, Krüger R, Baldinotti RS, Lenardão EJ, Luchese C, Savegnago L, Wilhelm EA, Alves D (2016) 7-Chloroquinoline-1,2,3-triazolyl carboxylates: organocatalytic synthesis and antioxidant properties. *J Braz Chem Soc* 27:41–53
 33. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996) National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals
 34. Walsh RN, Cummins RA (1976) The open-field test: a critical review. *Psychol Bull* 83:482–504
 35. De Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schroder N (2005) Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. *Exp Gerontol* 40:506–511
 36. Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95
 37. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
 38. Haradaa CN, Marissa C, Lovéc N, Triebeld K (2013) Normal cognitive aging. *Clin Geriatr Med* 29:737–752
 39. Barker GR, Warburton EC (2011) When is the hippocampus involved in recognition memory? *J Neurosci* 31:10721–10731
 40. Vandekerckhove S, D'hooghe M (2015) Quinoline-based antimalarial hybrid compounds. *Bioorg Med Chem* 23:5098–5119
 41. Akbaraly TN, Hinniger-Favier I, Carriere I, Arnaud J, Gourlet V, Roussel AM, Berr C (2007) Plasma selenium over time and cognitive decline in the elderly. *Epidemiol* 18:52–58
 42. Cechella JL, Leite MR, Rosario AR, Sampaio TB, Zeni G (2014) Diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise enhance novel object recognition memory in old rats. *Age* 36:9666
 43. Granholm AC, Boger H, Emborg ME (2008) Mood, memory and movement: an age-related neurodegenerative complex? *Curr Aging Sci* 1:133–139
 44. Kilimann I, Hausner L, Fellgiebel A, Filippi M, Wurdemann TJ, Heinsen H, Teipel SJ (2017) Parallel atrophy of cortex and basal forebrain cholinergic system in mild cognitive impairment. *Cereb Cortex* 27:1841–1848
 45. Das A, Dikshit M, Nath C (2001) Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. *Life Sci* 68:1545–1555
 46. Richter N, Michel A, Onur OA, Kracht L, Dietlein M, Tittgemeyer M, Neumaier B, Fink GR et al (2017) White matter lesions and the cholinergic deficit in aging and mild cognitive impairment. *Neurobiol Aging* 53:27–35
 47. Schliebs R, Arendt T (2011) The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res* 221:555–563
 48. Peters A, Sethares C, Luebke JI (2008) Synapses are lost during aging in the primate prefrontal cortex. *Neurosci* 152:970–981
 49. Wang M, Fu H, Xiao Y, Ai B, Wei Q, Wang S, Liu T, Ye L et al (2013) Effects of low-level organic selenium on lead-induced alterations in neural cell adhesion molecules. *Brain Res* 1530:76–81
 50. Nakayama J, Fukuda MN, Fredette B, Ranscht B, Fukuda M (1995) Expression cloning of a human polysialyltransferase that forms the polysialylated neural cell adhesion molecule present in embryonic brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7031–7035
 51. Scheidegger EP, Stenberg LR, Roth J, Lowe JB (1995) A human STX cDNA confers polysialic acid expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 270:22685–22688
 52. Hildebrandt H, Becker C, Murau M, Gerardy-Schahn R, Rahmann H (1998) Heterogenous expression of the polysialyltransferases ST8Sia II and ST8Sia IV during postnatal rat brain development. *J Neurochem* 71:2339–2348
 53. Rutishauser U (2008) Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci* 9:26–35

54. Cordner ZA, Tamashiro KL (2015) Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiol Behav* 152:363–371
55. Paradis E, Clavel S, Julien P, Murthy MR, de Bilbao F, Arsenijevic D, Giannakopoulos P, Vallet P et al (2004) Lipoprotein lipase and endothelial lipase expression in mouse brain: regional distribution and selective induction following kainic acid induced lesion and focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 15:312–325
56. Ricciarelli R, Canepa E, Marengo B, Marinari UM, Poli G, Pronzato MA, Domenicotti C (2012) Cholesterol and Alzheimer's disease: a still poorly understood correlation. *IUBMB Life* 64:931–935
57. He Q, Li Q, Zhao J, Wu J, Ji L, Huang G, Ma F (2016) Relationship between plasma lipids and mild cognitive impairment in the elderly Chinese: a case-control study. *Lipids Health Dis* 15:146
58. Haag MD, Hofman A, Koudstaal PJ, Stricker BH, Breteler MM (2009) Statins are associated with a reduced risk of Alzheimer disease regardless of lipophilicity. The Rotterdam Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:13–17

MANUSCRITO 1

**Role of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline as an anti-ageing drug fighting
the oxidative damage in different tissues of aged rats**

Manuscrito submetido para publicação na revista *Experimental Gerontology*

ANEXO 3 – Comprovante de submissão

Role of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline as an anti-ageing drug fighting oxidative damage in different tissues of aged rats

Cristiane Luchese ^{a*}, Anelise Barth ^a, Gabriel Pereira da Costa ^b, Diego Alves ^b, Diogo La Rosa Novo ^c, Márcia Foster Mesko ^c, Ethel Antunes Wilhelm ^{a*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Pesquisa em Farmacologia Bioquímica (LaFarBio), Grupo de Pesquisa em Neurobiotecnologia (GPN), Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Química, Laboratório de Síntese Orgânica Limpa (LASOL), Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Química e Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Laboratório de Controle de Contaminantes em Biomateriais (LCCBio), CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

*** Address for correspondence**

Cristiane Luchese - UFPel, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA), Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brazil; E-mail: cristiane_luchese@yahoo.com.br; Phone: 55-53-32757233

Ethel Antunes Wilhelm- UFPel, CCQFA, Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brazil; E-mail: ethelwilhelm@yahoo.com.br; Phone: 55-53-32757356 .

Abstract

The aim of this study was to investigate whether subacute treatment with 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) presented antioxidant action in oxidative stress caused by ageing in different rat tissues. We also investigated whether plasma selenium levels were altered in ageing, as well as the contribution of 4-PSQ administration to these levels. Wistar male aged rats (23 months-old) were intragastrically treated with 4-PSQ (5 mg/kg) for seven days. On the 14th day of the experimental protocol, plasma was collected to determine selenium levels and biochemical markers of renal and hepatic damage. Furthermore, liver, kidney, spleen and cerebral cortex were removed to determine thiobarbituric acid reactive species (TBARS), non-protein thiols (NPSH), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and δ -aminolevulinate dehydratase (ALA-D). Our results demonstrated that one or more parameters changed markedly in the liver, kidney, spleen and cerebral cortex of aged rats. Moreover, biochemical markers of renal and hepatic damage and selenium levels are changed in the plasma of aged rats. Treatment with 4-PSQ restored oxidative stress caused by ageing in tissues of rats, as well as plasma biochemical markers of renal and hepatic damage and selenium levels. In conclusion, 4-PSQ presented an antioxidant effect in tissues of aged rats, restoring selenium levels, which contributes to the restoration of the damage caused by ageing. Thus, 4-PSQ could be a potential candidate for the management of age-related oxidative damage, acting as an anti-ageing drug.

Keywords: Ageing, Quinoline, Selenium, Oxidative Stress, Antioxidant.

1. Introduction

Ageing is a gradual and natural process that occurs in organisms and causes damage to the integrity of various tissues. The ageing process is related to many diseases, including hypertension, type-2 diabetes, atherosclerosis, and senile dementia (Buford, 2016; Kitada et al., 2016; Chard et al., 2017). The ageing mechanisms are widely studied and an important hypothesis is closely connected with the redox disproportion in cells (Vinã et al., 2013; Rodier et al., 2018).

The accumulation of cellular senescence in organs and tissues that causes ageing is related to the oxidation-reduction imbalance, leading to the excessive production of reactive oxygen species (ROS) and/or decrease of ROS scavenging (Liochev, 2013). The increase in the production of ROS, such as hydrogen peroxide, by the mitochondria can cause oxidative damage in the body (Rao, 2009). Additionally, ageing-related diseases such as neurodegenerative diseases, tumor, and cardiovascular diseases, are risk factors linked with cellular senescence (Childs et al., 2015). For that reason, the decrease of ROS is the main target of anti-ageing therapy and the prevention of ageing-related diseases.

The antioxidant defense system of the body depends on large and various protection mechanisms to keep ROS originating from endogenous or exogenous sources at physiologically optimal levels (Birben et al., 2012). Then, antioxidant substances are optimized to scavenge oxidative impairment induced by ROS. In this context, selenium is of great importance, given that it possesses biological and antioxidant properties, and is used to reduce cellular oxidative damages (Amara et., 2009; Amraoui et al., 2018). Selenium is an essential micronutrient required in several proteins called selenoproteins, allowing the enzymes to be even more reactive (Zoidis et al., 2018).

Additionally, nitrogenous molecules, such as quinolines, improve the basicity of substances and they can form a strong hydrogen bond with the targets. The polarity of

quinolines can be used as a means to reduce the lipophilic character, improving water solubility and oral absorption (Alvarez et al., 2016). The quinoline analogs system-containing drugs are used as efficient treatments of malaria (Kaur et al., 2010) and also exhibit anticancer activities (Solomon et al., 2011). Furthermore, many studies suggest that quinoline derivatives have protective effects against oxidative stress, increasing the level of antioxidants (Wang et al., 2018; Ohwada et al., 2008).

Thus, based on important pharmacological properties of quinoline compounds and selenium, our research group has devoted special attention to the synthesis and evaluation of pharmacological effects of quinoline derivative compounds containing selenium (Savegnago et al., 2013; Pinz et al., 2016; Saraiva et al., 2016; Reis et al., 2017). In fact, 7-chloro-4-phenylselenanyl-quinoline (4-PSQ), a quinolone derivative with an organoselenium substituent, has demonstrated a significant number of pharmacological properties. This compound showed antioxidant action *in vitro* (Savegnago et al., 2013) and absence of toxicity (Reis et al., 2017). Moreover, our research group demonstrated that 4-PSQ presented antinociceptive and anti-inflammatory properties in mouse nociception models (Pinz et al., 2016, Silva et al., 2017), as well as anxiolytic-like action (Reis et al., 2017). Recently, Barth et al. (2019) demonstrated that 4-PSQ restored the cognitive impairment caused by ageing in rats, modulating the synaptic plasticity, cholinergic system, and cholesterol levels of aged rats. However, the antioxidant effect of this compound on the oxidative stress in the elderly has not yet been studied.

Based on the key issue that ageing causes an imbalance in redox homeostasis and in our interest in search of a new therapeutic alternative using 4-PSQ, the aim of this study was to investigate whether the subacute treatment with 4-PSQ presented antioxidant action in oxidative stress caused by ageing in different rat tissues. Moreover, we investigated whether

plasma selenium levels were altered in ageing, as well as the contribution of 4-PSQ administration to these levels.

2. Material and Methods

Animals

Young adult male Wistar rats (3 months-old, 10 % lifespan completed, weighing 180 - 250 g) and aged rats (23 months-old, 76.6 % lifespan completed, weighing 400-700g) were obtained from a local breeding colony. The animals were housed in cages with free access to food and water. They were kept in a separate air-conditioned ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) room, on a 12-h light/12-h dark cycle, with lights on at 7:00 a.m. Commercial diet and water were supplied *ad libitum*. Animal care and all experimental procedures were conducted in compliance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publications No. 80-23, revised in 1996) and in accordance with the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, Federal University of Pelotas, Brazil (CEEA 4599-2016). All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Drugs

4-PSQ was prepared and characterized in accordance with Duarte et al. (2017). Analysis of the ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) and ^{13}C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of 4-PSQ (99.9 %) was determined by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS). The compound was dissolved in canola oil. All other chemicals were of analytical grade and obtained from standard commercial suppliers.

Experimental protocol

Rats were randomly divided into 3 experimental groups (10 animals/group) (Table 1). In the young adults and aged groups, animals received the canola oil (1 ml/kg), while in the aged + 4-PSQ group, animals received the compound (5 mg/kg). Treatments with canola oil or 4-PSQ were performed for 7 days, daily, by intragastric (i.g.) route, using gavage. The dose of 4-PSQ was chosen based on previous studies by our group (Barth et al., 2019). Figure 2 illustrates the experimental protocol of this study.

Animals were allowed to rest until day 14 in order to avoid stress, when they were euthanized by inhalation of isoflurane for *ex vivo* assays. The experimental protocol was in agreement with Barth et al. (2019).

***Ex vivo* assays**

On day 14 of the experimental protocol, rats were anesthetized with isoflurane and blood samples were collected from the heart ventricle, using heparin as an anticoagulant to obtain plasma. Plasma was obtained by centrifugation (900 xg for 15 min) to determine the creatinine, urea and selenium levels, besides aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities.

Liver, kidney, spleen and cerebral cortex were immediately removed and dissected. The organs were separated and washed with cold saline solution (0.9 %) to determine thiobarbituric acid reactive species (TBARS), non-protein thiols (NPSH), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), δ -aminolevulinate dehydratase (ALA-D). The tissues were removed and immediately homogenized in cold 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 (1/10 weight/volume for liver, kidney and spleen and 1/5 weight/volume for cerebral cortex), centrifuged at 900 xg at 4°C for 10 min. The low speed supernatants (S1) were used for biochemical assays.

Determination of TBARS levels

TBARS levels were determined as described by Ohkawa et al. (1979) and used as a measure of lipid peroxidation. An aliquot of supernatant was added to the reaction mixture containing: 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.8% thiobarbituric acid and acetic acid buffer (pH 3.4). The system was incubated at 95°C for 2 h. Absorbance was measured at 532 nm in a spectrophotometer. Results were reported as nmol malondialdehyde (MDA)/mg protein.

Antioxidant defenses

CAT activity

Enzyme activity was assayed by the method of Aebi (1984), which involves monitoring the disappearance of H_2O_2 in the homogenate at 240 nm. This method is used to evaluate the activity of this enzymatic antioxidant defense, since the function of this enzyme is specifically to dissociate H_2O_2 into H_2O and O_2 . An enzymatic reaction was initiated by adding the supernatant and the substrate (H_2O_2) in a medium containing 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. The enzymatic activity was expressed as Unit (U) CAT/mg protein (1U decomposes 1 μmol H_2O_2 /min at pH 7 at 25°C).

GST activity

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm in accordance with Habig et al. (1974). This method is used to evaluate the activity of this phase 2 enzyme, which is responsible for the metabolism of xenobiotics. The reaction mixture contained an aliquot of supernatant, 0.1M potassium phosphate buffer pH 7.4, 100 mM glutathione reduced (GSH)

and 100 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), which was used as substrate. Enzyme activity was expressed as nmol CDNB conjugated/min/mg protein.

NPSH levels

NPSH levels were determined by the method of Ellman (1959). This method is used to evaluate the levels of non-enzymatic antioxidant defenses. Supernatant was mixed (1:1, volume/volume) with 10% trichloroacetic acid (TCA). Tubes were centrifuged at 900xg for 10 min. Then, the protein pellet was discarded and free-thiol (SH) groups were determined in the clear supernatant. An aliquot of supernatant was added to 1 M potassium phosphate buffer pH 7.4 and 10 mM 5,5' dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). The color reaction was measured at 412 nm in a spectrophotometer. NPSH levels were expressed as nmol NPSH/g tissue.

δ -ALA-D activity

δ -ALA-D is a sulfhydryl enzyme sensitive to situations of oxidative damage sensitive enzyme (Folmer et al., 2003). Enzyme activity was assayed by the method described by Sassa, with some modifications. The principle of this method is based on enzyme incubation with an excess of δ -aminolevulinic acid (δ -ALA). An aliquot of supernatant was pre-incubated for 10 min at 37°C. The enzymatic reaction was initiated by adding the substrate (δ -ALA) to a final concentration of 2.2 mM in a medium containing 45 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8. The incubation was carried out at 37° for 3 h for cerebral cortex and 1 h for liver, kidney and spleen. The incubation was stopped by adding an aliquot of 10% TCA with 10 mM HgCl₂. Porphobilinogen (PBG), reaction product, was measured at 555 nm, using modified Ehrlich's reagent. The values were expressed as nmol PBG/mg protein/h.

Liver and kidney damage biomarkers

The activity of AST and ALT, as well as urea and creatinine levels were determined in rat plasma through an automated kinetic colorimetric method (Cobas Integra 400 plus).

Determination of elemental selenium

Plasma digestion was performed using a microwave oven (Multiwave 3000, Anton Paar, Austria) equipped with eight high-pressure quartz vessels (maximum pressure, internal volume and temperature of 80 bar, 80 mL and 280°C, respectively). The analytes were determined using an inductively coupled plasma mass spectrometer (Elan DRC II, Perkin-Elmer-SCIEX, Canada) equipped with a concentric nebulizer (Meinhard Associates), a cyclonic spray chamber (Glass Expansion, Inc.) and a quartz torch with a quartz injector tube (2 mm i.d.). Instrumental performance was optimized following the instructions of the manufacturer and previous work published in the literature (Perkin et al., 2003; Maciel et al. 2014). The isotope monitored was ^{82}Se .

In the digestion procedure, rat plasma was added into the quartz vessels and 7 mol/L HNO_3 were included. Digestion vessels were closed, fixed to the rotor and submitted to the following irradiation program: (i) ramp to 10 min to 1000 W, (ii) 10 min at 1000 W, and (iii) 20 min at 0 W (cooling step). Nitric acid concentration was based on studies present in the literature because it was commonly used to digest complex matrices in the same microwave oven (Bizzi et al., 2011). Likewise, the microwave irradiation power was selected to avoid sudden spontaneous reactions during organic compound digestion. After the procedure, the final solutions were transferred to volumetric vessels and diluted with water. The procedures were performed in triplicate.

Limits of quantification (LOQs) were calculated from the mean of the blank values plus ten times the value of the standard deviation for 10 replicates. The sample mass, the final volume of digests, and the dilution factor were also taken into account. Accuracy was constantly evaluated by trueness using recovery tests and by precision using relative standard deviation.

Protein quantification

The protein concentration was measured by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as the standard.

Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.). Data were analyzed by Graphpad Prism[®] 5, the normality of data was evaluated by the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman-Keuls test, when appropriate. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. For the plasma selenium levels, results were statistically evaluated by Student's *t*-test (confidence level of 95%, $p > 0.05$).

3. Results

TBARS levels

Results showed significant differences in the TBARS levels in the rat liver ($F_{(2,27)} = 11.13$, $p < 0.001$), kidney ($F_{(2,27)} = 12.18$, $p < 0.001$) and spleen ($F_{(2,27)} = 11.40$, $p < 0.001$). TBARS levels were increased in both peripheral structures of aged rats (around 54% for the liver, 114% for the kidney and 41% for the spleen), when compared with the young adult rats (Fig. 3a, 3b, and 3c, respectively). There was no significant difference in TBARS levels in the

cerebral cortex of the aged rats, when compared with the young adults groups, but there is a trend (around 19% for the cerebral cortex) ($F_{(2,12)} = 3.25$, $p > 0.05$). Treatment with 4-PSQ was effective in restoring the TBARS levels in the liver (Fig. 3a), kidney (Fig. 3b) and spleen (Fig. 3c) of aged rats.

Antioxidant defenses

GST

Results showed significant differences in the GST activity in the kidney ($F_{(2,27)} = 9.12$, $p < 0.001$), spleen ($F_{(2,27)} = 5.88$, $p < 0.01$) and cerebral cortex ($F_{(2,12)} = 14.46$, $p < 0.001$) of rats. GST activity was reduced in the kidney (around 40%) and increased in the spleen (around 39%) and cerebral cortex (around 47%) of aged rats, when compared with the young adult rats (Table 1). There was no significant difference in the hepatic GST activity of the aged rats, when compared with the young adults groups ($F_{(2,26)} = 1.79$, $p > 0.05$). Treatment with 4-PSQ was effective in restoring the GST activity in the kidney, spleen and cerebral cortex (Table 1) of aged rats.

CAT activity

Results showed significant differences in the CAT activity in the liver ($F_{(2,27)} = 15.22$, $p < 0.0001$), kidney ($F_{(2,27)} = 9.12$, $p < 0.001$), spleen ($F_{(2,27)} = 5.80$, $p < 0.01$) and cerebral cortex ($F_{(2,12)} = 52.01$, $p < 0.0001$) of rats. CAT activity was decreased in the kidney (around 40%), spleen (around 40%) and cerebral cortex (around 55%), while there was an increase in the liver (around 43%) of aged rats, when compared with the young adult rats (Table 2). Treatment with 4-PSQ was effective in restoring the CAT activity in all tissues of aged rats (Table 2).

NPSH levels

Results showed significant differences in the NPSH levels in the liver ($F_{(2,27)} = 7.02$, $p < 0.01$) and kidney ($F_{(2,27)} = 18.12$, $p < 0.0001$) of rats. NPSH levels increased in the liver (around 43%) and decreased in the kidney (around 17%) of aged rats, when compared with the young adult rats (Table 3). There was no significant difference in NPSH levels in the spleen ($F_{(2,27)} = 1.54$, $p > 0.05$) and cerebral cortex ($F_{(2,12)} = 3.89$, $p > 0.05$) of the aged rats, when compared with the young adults groups. Treatment with 4-PSQ restored the NPSH levels in the liver and kidney of aged rats (Table 3).

δ -ALA-D activity

Results showed significant differences in the δ -ALA-D activity in the kidney ($F_{(2,27)} = 10.88$, $p < 0.001$) and spleen ($F_{(2,27)} = 4.82$, $p < 0.05$) of rats. δ -ALA-D activity was reduced in the kidney (around 38%) and spleen (around 37%) of aged rats, when compared with the young adult rats (Fig. 4b and 4c, respectively). There was no significant difference in δ -ALA-D activity in the cerebral cortex ($F_{(2,12)} = 1.37$, $p > 0.05$) and liver ($F_{(2,27)} = 2.41$, $p > 0.05$) of the aged rats, when compared with the young adults groups. Treatment with 4-PSQ restored the δ -ALA-D activity in the kidney (Fig. 4b) and spleen (Fig. 4c) of aged rats.

Liver and kidney damage markers

AST and ALT activities

Results showed significant differences in the AST ($F_{(2,27)} = 8.34$, $p < 0.01$) and ALT ($F_{(2,27)} = 10.52$, $p < 0.001$) activities in rat plasma. The transaminase activities increased in the plasma (around 65% for AST and 43% for ALT) of aged rats, when compared with the young adult rats (Table 4). Treatment with 4-PSQ restored the AST and ALT activities in the plasma of aged rats (Table 4).

Creatinine and Urea levels

Results showed significant differences in the creatinine ($F_{(2,27)} = 4.45$, $p < 0.05$) and urea ($F_{(2,27)} = 64.48$, $p < 0.0001$) levels in rat plasma. The creatinine levels increased (around 24%), while the urea levels decreased (around 34%) in the plasma of aged rats, when compared with the young adult rats (Table 4). Treatment with 4-PSQ was effective in restoring creatinine and urea levels in the plasma (Table 4) of aged rats.

3.4.2. Elemental Selenium blood levels

The results showed a significant difference in the elemental selenium levels ($F_{(2,7)} = 43.01$, $p < 0.0001$) in rat plasma. Elemental selenium levels were decreased in (around 28%) aged rat plasma, when compared with the young adult rats (Figure 5). Treatment with 4-PSQ significantly increased the elemental selenium levels in the plasma (Figure 5) of aged rats (around 69%), when compared with the young adult group.

4. Discussion

In the present study, we demonstrated that the ageing process caused changes in oxidative parameters, markers of tissue damage and selenium level in rats. Importantly, we provided evidence for the antioxidant effect of 4-PSQ, since that compound restored the age-related oxidative stress in rats, as well as markers of tissue damage and selenium levels. These results may mean that 4-PSQ could be a potential candidate for the management of age-related oxidative stress, acting as an anti-ageing drug.

The age-related pathologies including arthritis, diabetes, dementia, cancer, atherosclerosis, vascular diseases, obesity, osteoporosis, and metabolic syndromes are closely associated with an increase in ROS and subsequently in oxidative stress (Liu et al., 2017,

Liguori et al., 2018). The biological system modulates the cellular activities, such as cell survival, stressor responses, inflammation, and generate ROS (Zuo et al., 2015). There is evidence that a variety of ROS and other free radicals are directly involved in molecular damage, which can lead to structural and functional disorders in ageing. Elevation of ROS has been associated with the onset and progression of ageing (López-Otín et al., 2013; Lennicke et al., 2015).

In our study, we found an increase of oxidative stress in tissues of aged rats, given that one or more oxidative parameters (TBARS, NPSH, CAT and GST) changed markedly in the liver, kidney, spleen and cerebral cortex of aged rats. The imbalance between pro-oxidants and antioxidants resulting in oxidative stress associated with ageing has been extensively demonstrated (Cenini et al., 2019; Martínez et al., 2019). Indeed, ageing can result in a number of physiological modifications, which are responsible for the degradation of functional capacities. Although several research studies had been done on age-related oxidative stress in various tissues in rodents, unfortunately, these studies have sometimes produced a variety of conflicting results (Mo et al., 2017; Saio et al., 2016; Xu et al., 2009). The inconsistency of the results may be at least partly attributable to the differences in species, strain, sex and age of animals, assay methods, as well as experimental conditions. These inconsistencies reflect the rather complex relationships between an antioxidant system in various tissues and the ageing process. Regardless of this, in the present study, oxidative stress associated with ageing in all tissues studied was well characterized.

Importantly, in the present study, hepatic lesions caused by oxidative damage in ageing have been evidenced through an increase in the AST and ALT activities, as well as reduction in urea levels in the plasma of aged rats. Indeed, damage in hepatocytes leads to extravasation of intracellular contents into plasma, increasing the activity of transaminases (AST and ALT), which are good markers of cytolysis. These aminotransferases are normally

present in serum at low concentrations (Piñeiro-Carrero and Piñeiro, 2004) and our results point to a release of these enzymes from the liver in large amounts, showing that ageing damaged the hepatocyte membrane, probably due to oxidative stress. Moreover, plasma urea levels are usually associated with renal damage. However, urea is produced in the liver through the urea cycle, and reduced plasma urea levels have been found in situations of liver damage (Stevens et al., 2005). In this sense, we can infer that the reduction in plasma urea levels of aged rats may be a consequence of liver damage caused by ageing. Corroborating our results, Olukiran et al. (2018), showed that young adult rats had a significantly higher plasma urea concentration when compared with aged rats.

Additionally, cellular oxidative damage plays a key role in the pathogenesis of renal disorders (Sagoo and Gnudi, 2018). In this way, our results demonstrated an increase in the plasma creatinine levels with ageing. Creatinine is freely filtered at the glomerular level, and it is not reabsorbed in the renal tubules, therefore it is considered a more specific indicator of renal damage (Coles et al., 1986; Gunes et al., 2017). In accordance, Oliveira et al. (2016) demonstrated an increase in plasma creatinine levels in old rats, indicating renal damage. Moreover, a recent study showed that mediators of ROS generation were closely associated with kidney regulation in ageing (Chen et al., 2019). In this context, we can suppose that the increase in plasma creatinine levels is closely related to oxidative stress in the kidney caused by ageing, thus indicating renal damage.

The results presented above are in accordance with the inhibition of δ -ALA-D activity in kidney and spleen of aged rats found in the current study. Tentatively, the inhibition of δ -ALA-D activity by ageing could be related to an increase in lipid peroxidation (as demonstrated by TBARS levels) in kidney and spleen. In fact, the δ -ALA-D enzyme is extremely sensitive to situations associated with oxidative stress (Pande and Flora, 2002;

Folmer et al., 2003; Nogueira et al., 2004; Soares et al., 2016; Valentini et al., 2018; Vogt et al., 2018).

New strategies to scavenge ROS and reduce the age related-diseases have been extensively researched (Durieux et al., 2011; Bai et al., 2017). In this context, the most important result of the present study was that 4-PSQ restored the oxidative damage and tissue injury caused by ageing in different tissues of rats, as demonstrated by the restoration of oxidative stress parameters and plasma markers. 4-PSQ is a quinoline derivative with an organoselenium group that demonstrated several pharmacological properties. Outstanding among these properties is the antioxidant action. Indeed, most of the pharmacological properties of the compound are due to its antioxidant action (Pinz et al., 2016; Reis et al., 2017; De Freitas Couto et al., 2018; Pinz et al., 2018; Voss et al., 2018). The exact mechanism to explain the antioxidant action of 4-PSQ is not yet clear. We can suppose that it acts in different antioxidant defense lines and it has the capacity of reducing the ferric ion? (Savegnago et al., 2013). Moreover, Vogt et al. (2018) suggested that 4-PSQ acts in a similar manner to other organoselenium compounds, such as diphenyl diselenide and ebselen, to exert its antioxidant effect.

In addition, the antioxidant effect of 4-PSQ may be due to the increased availability of selenium in tissues. In fact, ageing is associated with a gradual depletion of essential minerals, such as selenium (Andres et al., 2007). Many diseases in ageing were associated with low levels of selenium, weakening the immune system and raising the susceptibility to cell damage and cancer (Wright et al., 2006). Our results showed low levels of selenium in plasma of aged rats, and notably, treatment with 4-PSQ restored these levels. In accordance with this, Vogt et al. (2018) revealed that the phenylselenanyl group present in the structure of 4-PSQ is extremely important for the antioxidant effect of this compound, since a quinoline derivative analogous to 4-PSQ but without an organoselenium substituent had no antioxidant effect.

Moreover, an increasing number of studies has shown that mechanisms by which selenium combats ageing are related to its antioxidant activity (Legrain et al., 2014; Cai et al., 2018). Therefore, we can infer that 4-PSQ increased selenium levels in plasma, and consequently in tissues, and this contributes to the antioxidant action of compound in ageing.

In conclusion, we showed that 4-PSQ restored oxidative damage caused by ageing, due to its antioxidant effect. Moreover, the increase in selenium levels following treatment with 4-PSQ may contribute to restoration of the damage caused by ageing. Thus, 4-PSQ could be a potential candidate for the management of age-related oxidative damage, acting as anti-ageing drug.

Acknowledgements

We are grateful for the financial support and scholarships from the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (UNIVERSAL 408874/2016-3), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (PRONEM 16/2551-0000240-1, PRONUPEQ 16/2551- 0000526-5, PqG 17/2551-0001013-2). CNPq is also acknowledged for the fellowship to D.A., M.F.M, E.A.W. and C. L. Authors also thank L'ORÉAL-UNESCO-ABC for Women in Science for their financial assistance.

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Meth Enzymol* 105:121–126.
- Álvarez R, Aramburu L, Puebla P, Caballero E, Gonzalez M, Vicente A, Medarde M, Pelaez R (2016) Pyridine based antitumour compounds acting at the colchicine site. *Curr Med Chem* 23:1100–1130.
- Amara BI, Fetoui H, Guermazi F, Zeghal N (2009) Dietary selenium addition improves cerebrum and cerebellum impairments induced by methimazole in suckling rats. *Int J Dev Neurosci* 27:719-726.
- Amraoui W, Adjabi N , Bououza F , Boumendjel M , Taibi F1 , Amel Boumendjel1 , Cherif Abdenmour2 and Mahfoud Messarah1 (2018) Modulatory Role of Selenium and Vitamin E, Natural Antioxidants, against Bisphenol A-Induced Oxidative Stress in Wistar Albinos Rats. *Toxicol Res* 34:231-239.
- Andres E, Vidal-Alaball J, Federici L, Loukili NH, Zimmer J, Kaltenbach G (2007) Clinical aspects of cobalamin deficiency in elderly patients. Epidemiology, causes, clinical manifestations, and treatments with special focus on oral cobalamin therapy. *Eur J Intern Med* 18:456–462.
- Bai K, Hong B, Hong Z, Sun J, Wang (2017) Selenium nanoparticles-loaded chitosan/citrate complex and its protection against oxidative stress in d-galactose-induced aging mice. *J Nanobiotechnol* 15:92.
- Barth A, Vogt AG, dos Reis AS et al. (2019) 7-Chloro-4-(Phenylselanyl) Quinoline with Memory Enhancer Action in Aging Rats: Modulation of Neuroplasticity, Acetylcholinesterase Activity, and Cholesterol Levels. *Mol Neurobiol* <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1530-5>

- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *W Allerg Org J* 5(1):9–19.
- Bizzi CA, Barin JS, Garcia EE, Nóbrega JÁ, Dressler VL, Flores EMM (2011) Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. *Spectrochimica Acta Part B* 66:394–398.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72:248–254.
- Buford TW (2016) Hypertension and aging. *Ageing Res Rev* 26:96–111.
- Cai Z, Zhang J, Li H (2018) Selenium, aging and aging-related diseases. *Aging Clin and Exp Res*. doi:10.1007/s40520-018-1086-7
- Cenini G, Lloret A, Cascella R (2019) Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From a Mitochondrial Point of View. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–18.
- Chard S, Harris-Wallace B, Roth EG et al (2017) Successful aging among African American older adults with type 2 diabetes. *J of Geront* 72:319–327.
- Chen YY, Yu XY, Chen L, Vaziri ND, Ma SC, Zhao YY (2019) Redox signaling in aging kidney and opportunity for therapeutic intervention through natural products. *Free Radic Biol and Med* 141:141–149.
- Childs BG, Durik M, Baker DJ et al (2015) Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nat Med* 21:1424–1435.
- Coles, E.H. *Veterinary Clinical Pathology*. 4th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, p.486, 1986.
- De Freitas Couto S, Machado Araujo S, Cardoso Bortolotto V, Rósula Poetini M, Cabral Pinheiro F, Santos Musachio EA, Prigol, M (2018) 7-chloro-4-(phenylselenenyl) quinoline prevents dopamine depletion in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's-like

- disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.doi:10.1016/j.jtemb.2018.10.015
- Duarte LFB, Barbosa ES, Oliveira RL, Pinz MP, Godoi B, Schumacher RF, Alves D (2017). A simple method for the synthesis of 4-arylselanyl-7-chloroquinolines used as in vitro acetylcholinesterase inhibitors and in vivo memory improvement. *Tetrah Lett*, 58:3319–3322.
- Durieux J, Wolff S, Dillin A (2011) The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell* 144:79–91
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77.
- Folmer V, Soares JC, Gabriel D, Rocha JB (2003) A high fat diet inhibits delta-aminolevulinate dehydratase and increases lipid peroxidation in mice (*Mus musculus*). *J Nutr* 133:2165–2170.
- Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 1996.
- Gunes S, Sahinturk V; Uslu S, Ayhanci A, Kacar S, Uyar R (2017) Protective Effects of Selenium on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and Kidney Injury. *Biological Trace Element Research*, 185(1):116–123.
- Habig W, Pabst M, Jakoby W (1974) The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Glutathione-S-transferase. *J Biol Chem* 249:7130–7139.
- Kaur K, Jain M, Reddy R P, Jain R (2010) Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. *Eur J Med Chem* 45:3245–3264.
- Kitada M, Ogura Y, Koya D (2016) The protective role of Sirt1 in vascular tissue: its relationship to vascular aging and atherosclerosis. *Aging* 8:2290–2307.

- Legrain Y, Touat-Hamici Z, Chavatte L (2014) Interplay between selenium levels, selenoprotein expression, and replicative senescence in WI-38 human fibroblasts. *J Biol Chem* 289:6299–6310
- Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B (2015) Hydrogen peroxide–production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal* 13:39.
- Liguori I, Russo G, Curcio F et al (2018) Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv in Aging* 13:757– 772.
- Liochev SI (2013) Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radic Biol Med* 60:1–4.
- Liu Z, Zhou T, Ziegler AC, Dimitrion P, Zuo L (2017) Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications. *Oxid Med Cell Longev*. doi: 10.1155/2017/2525967
- López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194–1217.
- Maciel JV, Knorr CL, Flores EMM, Müller EI, Mesko MF, Primel EG, Duarte FA (2014) Feasibility of microwave-induced combustion for trace element determination in *Engraulis anchoita* by ICP-MS. *Food Chem*, 145:927-931.
- Martínez de Toda I, Vida C, Sanz San Miguel L, De la Fuente M (2019) Function, Oxidative, and Inflammatory Stress Parameters in Immune Cells as Predictive Markers of Lifespan throughout Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 1:11.
- Mo ZZ, Liu YH, Li CL, Xu LQ, Wen LL, Xian YF, Su ZR 2017 Protective Effect of SFE-CO₂ of *Ligusticum chuanxiong* Hort Against d-Galactose-Induced Injury in the Mouse Liver and Kidney. *Rejuvenat Res* 20(3):231–243.
- Nogueira CW, Soares FA, Nascimento PC, Muller D, Rocha JBT (2003) 2,3-Dimercaptopropane-1-sulfonic acid and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid increase

- mercury and cadmium-induced inhibition of delta-aminolevulinate dehydratase. *Toxicol* 184:85-95.
- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104, 6255–6286.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358.
- Ohwada K, Takeda H, Yamazaki M, et al (2008) Pyrroloquinoline quinone (PQQ) prevents cognitive deficit caused by oxidative stress in rats. *J Clin Biochem Nutr* 42:29-34.
- Oliveira CS, Joshee L, Zalups RK, Bridges CC (2016) Compensatory renal hypertrophy and the handling of an acute nephrotoxicant in a model of aging. *Exp Geront* 75:16–23.
- Olukiran SO, Akomolafe RO, Ilesanmi OS, Imafidon CE, Alabi QK (2018) Age-related changes in urinary protein excretion in relation to indices of renal function in Wistar rats. *Animal Model Exp Med* 1(4):295-304.
- Pande M, Flora SJS (2002). Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of -lipoic acid and suc- cimers in rats. *Toxicol* 177:187–196.
- Perkin E (2003) SCIEX, Elan version 3.0, Software Guide, 1006920 A, Thornhill, Canada.
- Piñeiro-Carrero VM, Piñeiro EO (2004) Liver. *Pediatrics* 113:1097-106.
- Pinz M, Reis AS, Duarte V, da Rocha MJ, Goldani BS, Alves D, Savegnago L, Luchese C, Wilhelm EA (2016) 4-Phenylselenyl-7-chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. *Eur J Pharmacol* 780:122-128.
- Rao KS (2009) Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J of Biochem and Biophys* 46:9–15.

- Reis AS, Pinz M, Duarte LFB, Roehrs JA, Alves D, Luchese C, Wilhelm EA (2017) 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a novel multitarget compound with anxiolytic activity: contribution of the glutamatergic system. *J Psychiatr Res* 84:191–199.
- Rodier F, Zhou D, Ferbeyre G (2018) Cellular senescence, geroscience, cancer and beyond. *Aging*. <https://doi.org/10.18632/aging.101546>
- Sagoo MK, Gnudi L (2018) Diabetic nephropathy: is there a role for oxidative stress? *Free Radic Biol Med* 116:50–63.
- Saio V, Syiem D, Sharma R, Dkhar J (2016) Amelioration of age-dependent increase in oxidative stress markers in male mice by extract of *Potentilla fulgens*. *Redox Rep* 1:9.
- Saraiva MT, Krüger R, Baldinotti RS, Lenardão EJ, Luchese C, Savegnago L, Wilhelm EA, Alves D (2016) 7-Chloroquinoline-1, 2, 3-triazoyl carboxylates: organocatalytic synthesis and antioxidant properties. *J Braz Chem Soc* 27:41–53.
- Sassa S (1981) Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme* 28:133–145.
- Savegnago L, Vieira AI, Seus N, Goldani BS, Castro MR, Lenardão EJ, Alves D (2013) Synthesis and antioxidant properties of novel quinoline–chalcogenium compounds. *Tetrahedron Lett* 54:40–44.
- Silva VDG, Reis AS, Pinz MP, da Fonseca CAR, Duarte LFB, Roehrs JA, Alves D, Luchese C, Wilhelm EA (2017) Further analysis of acute antinociceptive and anti-inflammatory actions of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 31:513–25.
- Soares MSP, Oliveira PS, Debom GN, da Silveira Mattos B, Polachini CR, Baldissarelli J et. al (2016) Chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters and ALA-D activity in liver and kidney of young rats. *Amino Acids* 49(1):129–138.

- Solomon VR, Lee H (2011) Quinoline as a privileged scaffold in cancer drug discovery. *Curr Med Chem* 18:1488–508.
- Valentini J, Grotto D, Paniz C, Roehrs M, Burg G, Garcia SC (2008) The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. *Biomed Pharmacother* 62:378–382.
- Stevens LA, Levey AS (2005) Measurement of kidney function. *Med Clin North Am* 89(3):457-73.
- Viña J, Borras C, Abdelaziz KM et al (2013) The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 19:779–787.
- Vogt AG, Voss GT, de Oliveira RL, Paltian JJ et al. (2018) Organoselenium group is critical for antioxidant activity of 7-chloro-4-phenylselenyl-quinoline. *Chemico-Biologic Interac* 282:7.
- Voss GT, Oliveira RL, De Souza JF, Duarte LFB, Fajardo AR, Alves D, Luchese C, Wilhelm EA (2018) Therapeutic and technological potential of 7-chloro-4-phenylselenyl quinoline for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Mater Sci Eng C-Mater Biol Appl* 84:90-98.
- Xu J, Rong S, Xie B, Sun Z, Zhang L, Wu H, Liu L (2009) Rejuvenation of antioxidant and cholinergic systems contributes to the effect of procyanidins extracted from the lotus seedpod ameliorating memory impairment in cognitively impaired aged rats. *Europ Neuropsychopharm* 19(12):851–860.
- Wang Z, Li Y, Wang Y, Zhao K, Chi Y, Wang B (2018) Pyrroloquinoline quinine protects HK-2 cells against high glucose-induced oxidative stress and apoptosis through Sirt3 and PI3K/Akt/FoxO3a signaling pathway. *Biochem and Biophys Res Comm.* doi:10.1016/j.bbrc.2018.11.140

Wright TI, Spencer JM, Flowers FP (2006) Chemoprevention of nonmelanoma skin cancer. *J Am Acad Dermatol* 54(6):933-46.

Zoidis E, Seremelis I, Kontopoulos N, Danezi G (2018) Selenium-Dependent Antioxidant Enzymes: Actions and Properties of Selenoproteins. *Antioxidants* 7:66.

Zuo L, Zhou T, Pannell BK, Ziegler A, Best TM, (2015) Biological and physiological role of reactive oxygen species—the good, the bad and the ugly. *Acta Physiol* 214:329–348.

Tables

Table 1. Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on GST activity in the liver, kidney, spleen and cerebral cortex of aged rats.

	Liver	Kidney	Spleen	Cerebral Cortex
Young Adults	539 ± 31	66 ± 4	51 ± 3	13.2 ± 0.8
Aged	444 ± 46	39 ± 5***	71 ± 10*	19.5 ± 1.3**
Aged+4-PSQ	525 ± 37	57 ± 4 ^{##}	40 ± 3 ^{##}	13.4 ± 0.4 ^{###}

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) of ten animals per group for liver, kidney and spleen, and five animals per group for cerebral cortex. Glutathione S-transferase (GST) activity was expressed as nmol CDNB conjugated/min/mg protein. (*), (**) and (***) denotes $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, as compared to the young adults group; (##) and (###) denotes $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively, as compared to the aged group

Table 2. Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on CAT activity in the liver, kidney, spleen and cerebral cortex of aged rats.

	Liver ^a	Kidney ^a	Spleen ^a	Cerebral Cortex ^a
Young Adults	20.3 ± 1.3	65.6 ± 4.1	10.9 ± 1.0	1.16 ± 0.01
Aged	29.1 ± 1.8***	38.9 ± 5.5***	7.4 ± 0.5*	0.52 ± 0.07****
Aged+4PSQ	20.5 ± 0.4###	57.1 ± 3.7##	10.4 ± 0.7#	1.25 ± 0.05####

Data are expressed as mean ± standard error of the mean (SEM) of ten animals per group for liver, kidney and spleen, and five animals per group for cerebral cortex. Catalase (CAT) activity was expressed as CAT/mg protein (*), (***) and (****) denotes p<0.05, p<0.001 and p<0.0001, respectively, as compared to the young adults group; (#), (##), (###) and (####) denote p<0.05, p<0.01, p<0.001 and p<0.0001, respectively, as compared to the aged group.

Table 3. Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the NPSH levels in liver, kidney, spleen and cerebral cortex of aged rats.

	Liver ^a	Kidney ^a	Spleen ^a	Cerebral Córtex ^a
Young Adults	7.7�0.1	2.5�0.1	2.58 � 0.03	1.51 � 0.02
Aged	10.1�0.7**	2.1�0.1*****	2.77 � 0.12	1.48 � 0.02
Aged+4-PSQ	8.4�0.4 [#]	2.4�0.1 ^{###}	2.68 � 0.02	1.61 � 0.05

Data are expressed as mean   standard error of the mean (SEM) of ten animals per group for liver, kidney and spleen, and five animals per group for cerebral cortex. Non-protein thiols (NPSH) levels were expressed as nmol NPSH/g tissue (**), (****) denote p<0.01 and p<0.0001, respectively, as compared to the young adults group; (#), (###) denote p<0.05 and p<0.001, respectively, as compared to the aged group.

Table 4. Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the hepatic and renal markers in plasma of aged rats.

	Young adults	Aged	Aged + 4-PSQ
AST (U/L)	154 � 14	255 � 35**	134 � 7 [#]
ALT (U/L)	47 � 3	67 � 5**	52 � 3 ^{###}
Creatinine (mg/dl)	0.29 � 0.02	0.36 � 0.03*	0.26 � 0.01 [#]
Urea (mg/dl)	47.1 � 1.1 ^{####}	31.2 � 1.1*****	36.0 � 0.8 ^{##}

Data are expressed as mean   standard error of the mean (SEM) of ten animals per group. Aspartate aminotransferase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT). (*), (**) and (****) denote p<0.05, p<0.01 and p<0.0001, respectively, as compared to the young adults group; (#), (##), (###) and (####) denote p<0.05, p<0.01, p<0.001 and p<0.0001, respectively, as compared to the aged group.

Figure captions

Fig. 1 Chemical structure of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ).

Fig. 2 The experimental protocol. Aged rats were intragastrically (i.g.) treated for seven days with 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) (5 mg/kg) or vehicle (canola oil) (1 ml/kg). Young adults animals received the vehicle. On the 14th day, animals were euthanized by inhalation of isoflurane for *ex vivo* assays.

Fig. 3 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels in liver (A), kidney (B) spleen (C) and cerebral cortex (D). Data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM). (***) denotes $p < 0.001$ as compared to the young adults group. (##) denotes $p < 0.01$ and (###) denotes $p < 0.001$ as compared to the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test). MDA means malondialdehyde.

Fig. 4 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the δ -aminolevulinate dehydratase (δ -ALA-D) activity in liver (A), kidney (B) spleen (C) and cerebral cortex (D). Data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of ten animals per group. (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the young adults group (***) denotes $p < 0.001$ as compared to the young adults group. (#) denotes $p < 0.01$ as compared to the aged group (one-way analysis of variance/Newman-Keuls test).

Fig. 5 Effect of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline (4-PSQ) on the elemental selenium in plasma. Data are reported as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) of four animals per

group. (*) denotes $p < 0.05$ as compared to the young adults group. (###) denotes $p < 0.001$ as compared to the aged group. (Student's *t*-test (confidence level of 95%, $p > 0.05$)).

Figures

Figure 1

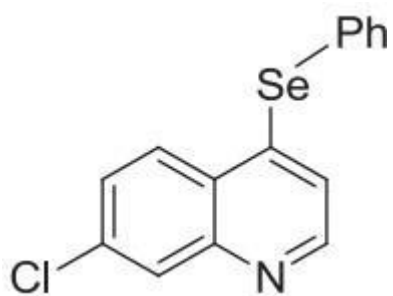


Figure 2

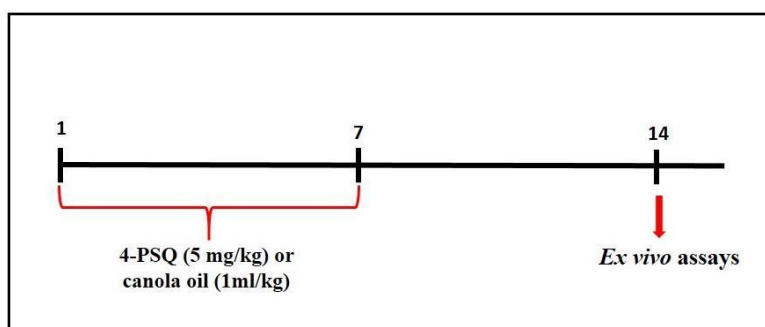


Figure 3

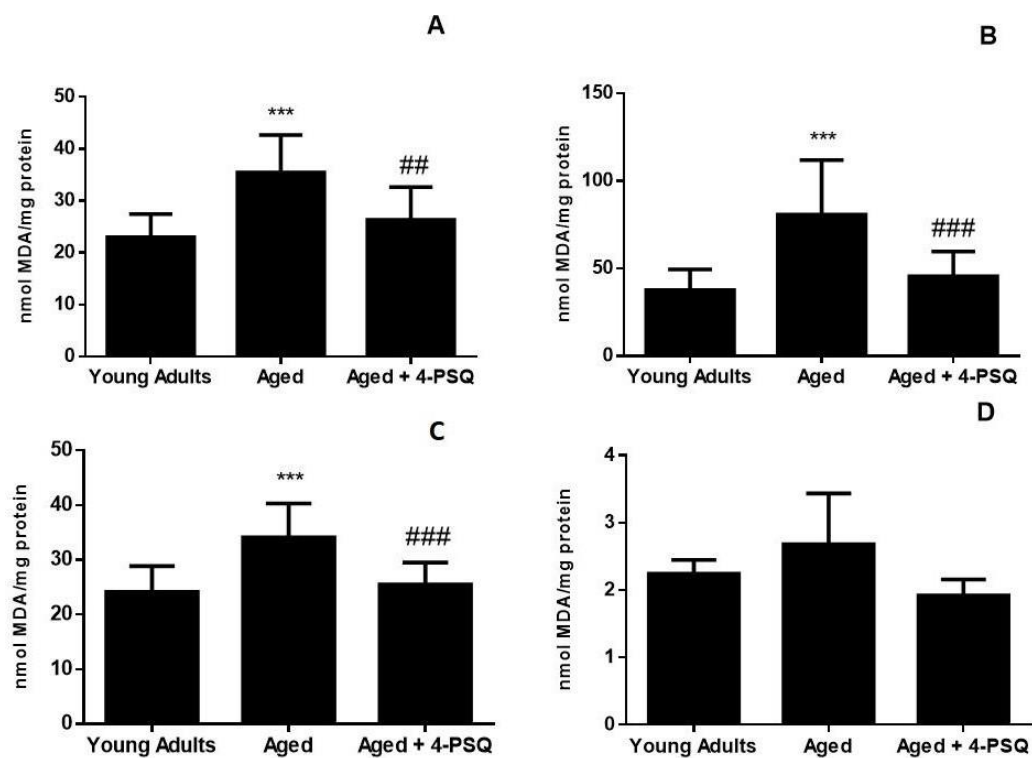


Figure 4

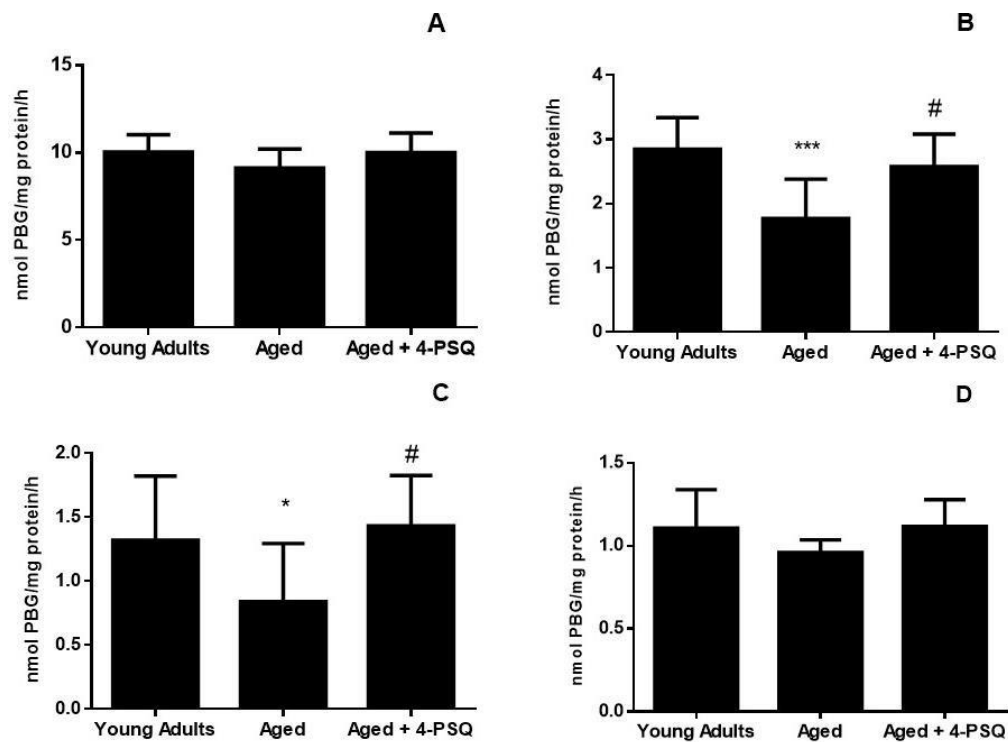
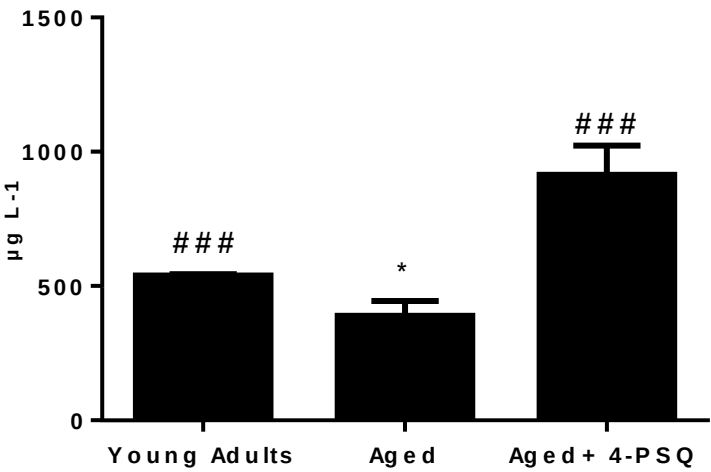


Figure 5



5. DISCUSSÃO

O envelhecimento pode ser entendido como um processo dinâmico e progressivo, caracterizado tanto por alterações morfológicas, funcionais e bioquímicas, podendo levar a redução das funções cognitivas e aumentar a susceptibilidade a doenças associadas à idade (CARVALHO e PAPALÉO, 2006). Desta forma, a utilização de agentes para combater os efeitos do envelhecimento se tornam essenciais. Visto que evidências na literatura apontam importantes propriedades farmacológicas de compostos quinolínicos contendo o elemento selênio, nosso grupo de pesquisa dedicou atenção especial à síntese e avaliação dos efeitos farmacológicos desses compostos (Savegnago et al., 2013; Pinz et al., 2016; Saraiva et al., 2016; Reis et al., 2017). Dentre esses compostos, destaca-se o 4-PSQ, um derivado de quinolina com um substituinte organoselênio, o qual demonstrou um número significativo de propriedades farmacológicas. Este composto apresentou ação antioxidante *in vitro* (Savegnago et al., 2013) e ausência de toxicidade (Reis et al., 2017). Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou que o 4-PSQ apresentava propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias em modelos de nocicepção de camundongos (Pinz et al., 2016; Silva et al., 2017), além de ação semelhante a ansiolítica (Reis et al., 2017). Neste contexto, o presente estudo avaliou o possível efeito restaurador do 4-PSQ na disfunção cognitiva, na neuroplasticidade e no estresse oxidativo causados pelo envelhecimento em ratos (Wistar).

Primeiramente foi investigado o efeito do 4-PSQ no déficit de memória causado pelo envelhecimento em ratos (**Artigo 1**). Está bem descrito na literatura que o envelhecimento leva a um comprometimento da função cognitiva (HOFER et al., 2003). Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente o efeito do 4-PSQ no comprometimento de memória e cognição em um modelo de doença de Alzheimer em camundongos (PINZ et al., 2018). Sendo assim, no presente estudo foi verificado que os ratos velhos apresentaram déficit nas memórias de curto e longo prazo e que o tratamento com o 4-PSQ foi eficaz em restaurar esse prejuízo de memória. Estes resultados corroboram com os encontrados na literatura, que demonstraram que os compostos orgânicos de selênio apresentam efeito no tratamento do comprometimento de cognição em ratos velhos (BORTOLATTO et al., 2012; CECHELLA et al., 2014).

O sistema biológico mais comprometido com o envelhecimento é o SNC (CANÇADO e HORTA, 2002). No envelhecimento, diversos mecanismos estão envolvidos no prejuízo de memória levando a diversas alterações no SNC como, redução no número de neurônios, redução na velocidade de condução nervosa, redução da intensidade dos reflexos e da capacidade de coordenações (DE VITTA, 2000). Os processos cognitivos mediados pelo hipocampo e pelo córtex pré-frontal são afetados pelo envelhecimento. Sendo assim, a neurotransmissão colinérgica prejudicada contribui para a disfunção cognitiva (SPECK-PLANCHE et al., 2012; AHMED et al., 2013). No presente estudo foi possível observar uma redução na atividade da AChE em estruturas cerebrais de ratos idosos, em comparação com os ratos adultos jovens e o tratamento com o 4-PSQ foi efetivo em proteger contra a mudança na atividade da AChE em ambas estruturas cerebrais. De fato, uma redução na atividade da AChE é um importante marcador na disfunção da neurotransmissão colinérgica relacionada com a idade (MASILAMONI et al., 2008; KILIMANN et al., 2017). Uma vez que, Das e colaboradores (2001) demonstraram que o envelhecimento causou uma redução na síntese e liberação de ACh com uma consequente redução na diminuição na atividade da AChE.

Outro mecanismo que contribui para o prejuízo da memória está relacionado com a redução na neurogênese e na neurodegeneração (BROOK et al., 2000; PUZZO et al., 2015). Os resultados do presente estudo demonstraram uma diminuição na expressão da NCAM no hipocampo e córtex cerebral dos ratos velhos, quando comparado com os ratos jovens. O tratamento com o 4-PSQ restaurou a diminuição na expressão da NCAM, atingindo os níveis encontrados nas estruturas cerebrais dos ratos adultos jovens. As NCAMs são apontadas como indispensáveis para a formação e consolidação de aprendizagem e memória (WANG et al., 2013). Nos adultos, a expressão dessa molécula de adesão está limitada a certas áreas cerebrais associadas a plasticidade neurônio-glia e comunicação (FAIVRE-SARRAILH et al., 2004). Sendo assim, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que o tratamento com o 4-PSQ mostrou um impedimento na *downregulation* da expressão da NCAM nas estruturas cerebrais dos ratos velhos.

Ainda, o envelhecimento levou a um *downregulation* na expressão da PST nas estruturas cerebrais dos ratos em comparação com os ratos adultos jovens. No entanto, nenhuma alteração foi encontrada na expressão da STX em ambas as

estruturas cerebrais. A PST (ou ST8SialIV) e a STX (ou ST8SialII) são polissialiltransferases responsáveis por sintetizar o ácido α -2,8-polissialílico e o adiciona aos domínios extracelulares da NCAM (PSA-NCAM). Durante o desenvolvimento embrionário e período pós-natal, a PSA-NCAM é intensamente expressa, predominando a atividade da STX. Na vida adulta, a PSA-NCAM é restrita a regiões específicas do cérebro, como hipocampo e córtex cerebral, que tem papel na plasticidade sináptica e na migração celular, sendo a PST a principal associada à α -2,8-polissialilação (CORDNER et al., 2015). Os resultados deste estudo sugerem que o envelhecimento diminuiu a expressão da PST no hipocampo e no córtex cerebral de ratos, diminuindo a plasticidade sináptica nessas regiões cerebrais, assim como demonstrado por RUTISHAUSER e colaboradores (2008). Sendo assim, o tratamento com o 4-PSQ aumentou significativamente os níveis de PST em ambas as estruturas cerebrais nos ratos idosos. Esses resultados indicaram que o 4-PSQ restaurou as poliassialiltransferases, principalmente a PST, aumentando a polissialilação da NCAM, restaurando a plasticidade sináptica nas estruturas cerebrais de ratos idosos, melhorando as funções cognitivas nas tarefas comportamentais.

Adicionalmente, a dislipidemia, juntamente com outros fatores de risco vasculares, têm sido associado a um risco relativo aumentado de desenvolvimento de demência durante o processo de envelhecimento (KLOPPENBORG et al., 2008). A literatura indica que altos níveis séricos de colesterol podem afetar o funcionamento do cérebro. Esse desequilíbrio no perfil lipídico leva a um declínio na aprendizagem e memória (STOUGH et al., 2019). Neste trabalho foi verificado um aumento nos níveis de colesterol no plasma dos ratos velhos. Corroborando com este resultados, um estudo longitudinal demonstraram associações entre marcadores de dislipidemia e uma piora da função cognitiva (DE FRIAS et al. 2007). Sendo assim, o tratamento com o 4-PSQ foi capaz de diminuir os níveis de colesterol dos ratos velhos. Esses resultados são promissores pois a literatura sugere que oscilações no metabolismo do colesterol, como um aumento dos seus níveis séricos, potencialmente aumentam os níveis neuronais, promovendo a clivagem do precursor de proteína amiloide e prejudicando a memória (BAUM et al., 1999; PARADIS et al., 2004; SATHYA et al., 2016). Os resultados deste estudo demonstraram, pela primeira vez, que o 4-PSQ apresentou efeito no metabolismo do colesterol. O 4-PSQ foi capaz de restaurar os níveis séricos do colesterol dos animais envelhecidos.

Com o envelhecimento, o sistema nervoso apresenta uma redução da intensidade dos reflexos, restrição das respostas motoras, do poder de reações e da capacidade de coordenações (DE VITTA, 2000). Neste trabalho pode-se observar uma diminuição na atividade locomotora e exploratória nos ratos idosos no teste do campo aberto em comparação com ratos jovens. Esses resultados corroboram com outros estudos que revelaram que a idade avançada pode causar uma redução do comportamento exploratório dos roedores (PARDON et al., 2000; BORTOLATTO et al., 2012). Neste contexto, o tratamento com o 4-PSQ por sete dias protegeu contra o comprometimento do comportamento exploratório causado pelo envelhecimento.

Tendo em vista estes resultados, o **artigo 1** demonstrou que o 4-PSQ restaurou o prejuízo cognitivo causado pelo envelhecimento em ratos. Além disso, o composto modulou a plasticidade sináptica, o sistema colinérgico e os níveis de colesterol em ratos velhos. Então os resultados obtidos no **artigo 1** contribuem fortemente para a pesquisa de um novo agente terapêutico para o déficit de memória em idosos.

Em 1981, Harman sugeriu uma única causa para o envelhecimento, modificada por fatores genéticos e ambientais e que, os RLs estariam envolvidos tanto no envelhecimento como em doenças, ou ainda, em alterações relacionadas com a idade. Essa teoria continua sendo bastante aceita uma vez que os RLs são produzidos constantemente durante o metabolismo normal dos organismos aeróbios. Mudanças que possam ocorrer com a idade, aumentando as taxas pró-oxidantes ou diminuindo os mecanismos de defesa antioxidante, podem ser a explicação para muitas das alterações orgânicas que ocorrem com o envelhecimento em diversos processos, como por exemplo os neurodegenerativos (De SOUZA e BOHR, 2002). Além do cérebro, o fígado, rim e baço são tecidos suscetíveis ao estresse oxidativo (RAYMAN, 2012).

Para investigar o estresse oxidativo e o efeito antioxidante do 4-PSQ em diferentes tecidos no envelhecimento foi realizado o estudo apresentado no **manuscrito 1**. Através dos resultados encontrados foi possível verificar um aumento do estresse oxidativo nos tecidos de ratos idosos, uma vez que um ou mais parâmetros oxidativos (TBARS, NPSH, CAT e GST) mudaram significativamente no fígado, rim, baço e córtex cerebral. As ERs podem causar diversos danos, agindo diretamente sobre proteínas, lipídios e DNA. As membranas celulares sofrem ação direta das ERs, tendo em vista que elas apresentam em sua estrutura uma dupla

camada lipídica, com grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, associadas as proteínas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Estes ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas são mais susceptíveis a sofrerem ação oxidante das ERs (CHAIYASIT et al., 2007; FRANKEL, 2014). Com isso, as ERs causam a lipoperoxidação, que leva a diminuição da fluidez, dano das proteínas, desarranjos e inativação de receptores, de enzimas, de canais de íons e potencialização da lise celular (LIMA e ABDALLA, 2001).

Os resultados deste estudo também demonstraram um dano celular nos tecidos hepático e renal nos animais envelhecidos, uma vez que observou-se um aumento dos marcadores bioquímicos plasmáticos (AST, ALT, ureia e creatinina). De fato, a lesão hepática causada pelo dano oxidativo no envelhecimento tem sido evidenciado através do aumento na atividade da AST e ALT, bem como da redução nos níveis de ureia no plasma dos ratos velhos. O dano aos hepatócitos leva a um extravasamento do conteúdo intracelular para o plasma, aumentando a atividade da AST e a ALT que são indicadores sensíveis de lesão celular hepática. Estas aminotranferases estão normalmente presentes no soro em baixas concentrações e são liberadas do fígado em maiores quantidades quando há lesão da membrana celular do hepatócito (PIÑEIRO-CARRERO e PIÑEIRO, 2004). Dessa forma, a liberação destas enzimas a partir do fígado e aumento delas na corrente sanguínea mostram que o envelhecimento causa um dano na membrana do hepatócito, provavelmente devido aos estresse oxidativo (STEVENS et al., 2005). Além disso, os níveis de ureia plasmáticos são geralmente associados com uma lesão renal. Entretanto, a ureia é produzida no fígado através do ciclo da ureia e uma redução nos níveis de ureia tem sido encontradas em situações de dano hepático (STEVENS et al., 2005). Neste contexto, pode-se inferir que uma redução na ureia plasmática nos ratos velhos pode ser uma consequência do dano hepático causado pelo envelhecimento. Corroborando com estes resultados, Olukiran e colaboradores (2018) mostraram que ratos velhos apresentam menores níveis de ureia plasmáticos que ratos adultos jovens.

Importantemente, o estresse oxidativo também pode causar desordens renais (SAGOO e GNUDI, 2018). De fato, os resultados do presente estudo demonstraram um aumento nos níveis de creatinina plasmática nos ratos velhos e o tratamento com o 4-PSQ restaurou estes níveis. A creatinina é eliminada do organismo através dos rins, que são responsáveis pela depuração desta substância nitrogenada não-

proteicas. A creatinina é filtrada livremente ao nível glomerular, não sendo reabsorvida nos túbulos renais, por tal razão é considerada um indicador mais específico de lesão renal (COLES, 1986; HENRIQUES et al., 2016). Além disso, Gunes e colaboradores (2017) demonstraram que a deficiência de selênio causa um estresse oxidativo e uma consequente diminuição da função renal, resultando em uma excreção renal deficiente de creatinina e um aumento desta na corrente sanguínea. Com estes resultados, pode-se supor que o aumento nos níveis de creatinina plasmática está diretamente relacionada com o estresse oxidativo no rim causado pelo envelhecimento, indicando uma lesão renal. Além disso, o efeito do 4-PSQ em combater a lesão renal, provavelmente, está relacionada ao efeito antioxidante.

Os resultados apresentados acima estão de acordo com a inibição na atividade da δ -ALA-D no rim e baço dos ratos envelhecidos encontrados neste estudo. A inibição da atividade da δ -ALA-D pelo envelhecimento pode estar relacionada a um aumento na peroxidação lipídica (como demonstrado pelos níveis de TBARS) no rim e no baço. De fato, δ -ALA-D é uma enzima extremamente sensível a situações associadas à oxidação (SOARES et al., 2016; VALENTINI et al., 2018; VOGT et al., 2018). Além disso, o 4-PSQ restaurou a atividade da δ -ALA-D no rim e no baço dos ratos velhos devido ao efeito antioxidante do composto.

Com isso, os resultados do **manuscrito 1** indicam que o 4-PSQ restaurou o dano oxidativo e a injúria tecidual causados pelo envelhecimento em diferentes tecidos de ratos. Este é um importante resultado já que novas estratégias para o combate das ERs e a redução das doenças relacionadas com a idade tem sido extensivamente pesquisadas (DURIEUX et al., 2011; BAI et al., 2017). O 4-PSQ é um derivado de quinolina contendo um grupo organoselênio que tem apresentado diversas propriedades farmacológicas, tais como a ação antioxidante (PINZ et al., 2016, 2018; REIS et al., 2017; De FREITAS COUTO et al., 2018; VOGT et al., 2018; VOSS et al., 2018). Entretanto, ainda não se sabe o exato mecanismo para explicar a ação antioxidante do 4-PSQ. Através dos estudos publicados e do presente estudo pode-se supor que o composto age em diferentes linhas de defesa antioxidante. Além disso, Vogt e colaboradores (2018) sugeriram que o 4-PSQ age de maneira similar a outros compostos orgânicos de selênio, como por exemplo o $(\text{PhSe})_2$ e o ebselen, para exercer o efeito antioxidante.

Em adição, o aumento da disponibilidade de selênio nos tecidos pode estar

relacionado com o efeito antioxidante do 4-PSQ. Andres e colaboradores (2007) mostraram que muitas doenças relacionadas com o envelhecimento estão diretamente correlacionadas com a diminuição dos minerais essenciais, como o selênio. Os resultados do presente estudo mostraram que os ratos velhos apresentaram baixos níveis de selênio no plasma e que o tratamento com o 4-PSQ restaurou estes níveis. Neste contexto, Vogt e colaboradores (2018) demonstraram que o grupamento fenilselanil presente na estrutura do 4-PSQ é essencial para o efeito antioxidante deste composto, uma vez que o derivado de quinolina análogo ao 4-PSQ mas sem substituinte de organosselênio não teve efeito antioxidante. Adicionalmente, um número crescente de estudos tem mostrado que os mecanismos pelos quais o selênio combate o envelhecimento estão relacionados à sua atividade antioxidante (LEGRAIN et al., 2014; CAI et al., 2018). Dessa forma, pode-se inferir que o 4-PSQ aumentou os níveis de selênio no plasma e, conseqüentemente, nos tecidos, e isso contribui para a ação antioxidante do composto no envelhecimento.

Através do conjunto de resultados obtidos com o **manuscrito 1** foi possível verificar que o 4-PSQ restaurou o dano oxidativo causado pelo envelhecimento devido ao seu efeito antioxidante. Além disso, o aumento nos níveis de selênio após o tratamento com o 4-PSQ podem contribuir para a restauração do dano causado pelo envelhecimento.

Dessa forma, os resultados do **artigo 1** e do **manuscrito 1** indicam que o 4-PSQ poderia ser um candidato a ser utilizado como agente antienvelhecimento, uma vez que foi eficiente em restaurar o déficit de memória e o estresse oxidativo tecidual causado pela idade.

6. CONCLUSÕES

- ❖ O 4-PSQ, um derivado de quinolina contendo um grupo organoselênio, amenizou a perda de memória e os danos cognitivos causados pelo envelhecimento em ratos;
- ❖ O tratamento com o 4-PSQ promoveu uma melhora na atividade locomotora e exploratória dos animais velhos;
- ❖ O 4-PSQ melhorou a neuroplasticidade em estruturas cerebrais dos ratos velhos;
- ❖ O tratamento com o 4-PSQ modulou o sistema colinérgico em hipocampo e córtex cerebral dos ratos velhos;
- ❖ Os níveis séricos de colesterol foram restaurados após o tratamento dos ratos velhos com o 4-PSQ;
- ❖ O 4-PSQ restaurou as injúrias renais e hepáticas causadas pelo envelhecimento em ratos;
- ❖ O composto apresentou efeito antioxidante, restaurando os parâmetros de estresse oxidativo e a inibição da enzima δ -ALA-D em diferentes tecidos de ratos velhos;
- ❖ Os animais envelhecidos tratados com o 4-PSQ aumentaram seus níveis plasmáticos de selênio.

7. PERSPECTIVAS

- Avaliar as comorbidades depressão e ansiedade relacionadas com o envelhecimento, bem como avaliar o efeito do 4-PSQ;
- Investigar outros mecanismos de ação do 4-PSQ no tratamento do envelhecimento, tais como as moléculas de sinalização envolvidas na neuroplasticidade e neurogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHESON, R.M. An Introduction to the Chemistry of Heterocycles Compounds. 3^a ed. Canada: John Wiley & Sons, p.501, 1977.

ADEDARA, I.A.; OWOEYE, O.; AWOGBINDIN, I.O.; AJAYI, B.O.; ROCHA, J.B.T.; FAROMBI, E.O. Diphenyl diselenide abrogates brain oxidative injury and neurobehavioural deficits associated with pesticide chlorpyrifos exposure in rats. **Chemical Biological Interactions**, v.296, p.105-116, 2018.

AHMED, F.; GHALIB, R.M.; SASIKALA, P.; AHMED, K.K. Cholinesterase inhibitors from botanicals. **Pharmacognition Review**, v.7, p.121-130, 2013.

ALMONDES, K. G. S. et al. The role of selenoproteins in câncer. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.56, p.484-488, 2010.

ANDRES, E.; VIDAL-ALABALL, J.; FEDERICI, L.; LOUKILI, N.H.; ZIMMER, J.; KALTENBACH, G. Clinical aspects of cobalamin deficiency in elderly patients. Epidemiology, causes, clinical manifestations, and treatments with special focus on oral cobalamin therapy. **European Journal of International Medicine**, v.18, p.456-462, 2007.

ANI, M.; MOSHTAGHIE, A.A.; AGHADAVOOD, M. Protective effects of selenium and zinc on the brain acetyl cholinesterase activity in lead intoxicated rat. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v.1, p.80-84, 2006.

AONURM-HELM, A.; JAAKO, K.; JÜRGENSON, M.; ZHARKOVSKY, A. Pharmacological approach for targeting dysfunctional brain plasticity: Focus on neural cell adhesion molecule (NCAM). **Pharmacological Research**, v.113, p.731-738, 2016.

ARGIMON, I.I.L.; STEIN, L.M. Habilidades cognitivas em indivíduos muito idosos: um estudo longitudinal. **Cad. de Saúde Pública**, v, 21, n.1, p. 64-72, 2005.

ARPAWONG, T.E. et al. Genetic variants specific to aging-related verbal memory: Insights from GWASs in a population-based cohort. **PLoS One**, v.12, n.8, p. 1-27, 2017.

AUGUSTIJNS, P.; GEUSENS, P.; VERBEKE, N. Chloroquine levels in blood during chronic treatment of patients with rheumatoid arthritis." **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.42, n.4, p.429-433, 1992.

BAI, K.; HONG, B.; HONG, Z.; SUN, J. Selenium nanoparticles-loaded chitosan/citrate complex and its protection against oxidative stress in d-galactose-induced aging mice. **Journal of Nanobiotechnology**, v.15, p.92, 2017.

BARE, T.M.; BROWN, D.G.; HORCHLER, C.L.; MURPHY, M.; et al. Pyridazinoquinolinetrienes as NMDA glycine-site antagonists with oral antinociceptive activity in a model of neuropathic pain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.50, p.3113-3131, 2007.

BAUM, L.; CHEN, L.; MASLIAH, E.; CHAN, Y.S.; NG, H.K.; PANG, C.P. Lipoprotein lipase mutations and Alzheimer's disease. **American Journal of Medical Genetics**, v.88, p.136-139, 1999.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 2, p. 547-581, 1998.

BENDICH, A. Physiological role of antioxidants in the immune system. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 9, p. 2789-2794, 1993.

BENTON, D. Selenium intake, mood and other aspects of psychological functioning. **Nutritional Neuroscience**, v.5, p.363-374, 2002.

BERNOTAS, R.C.; SINGHAUS, R. R.; KAUFMAN, D. H.; TRAVINS, J.W.; ULLRICH, R.; UNWALLA, E. QUINET, M.; EVANS, P. ; NAMBI, A. 4-(3-Aryloxyaryl) quinoline sulfones are potent liver X receptor agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 20, p. 209-212, 2010.

BERR, C.; ARNAUD, J.; AKBARALY, T.N. Selenium and cognitive impairment: a brief-review based on results from the EVA study. **Biofactors**, v. 38, n.2, 139-144, 2012.

BERR, C.; et al. Cognitive decline is associated with systemic oxidative stress: the EVA study. Etude du Vieillissement Artériel. **Journal of American Geriatric Social**, v.48, n. 10, 1285- 91, 2000.

BERTOLIN, T.E.; FURLONG, E.B.; COSTA, J.A.V. Radicais livres e o processo de envelhecimento. In: PORTELLA, M.R.; PASQUALOTTI, A.; GAGLIETTI, M. (Org.). Envelhecimento humano: saberes e fazeres. Passo Fundo: **UPF Editora**, p. 77-95, 2006.

BHASIN, K. K. Synthesis and characterization of novel quinolone selenium compounds: X-ray structure of 6-methoxy-3H-[1,2]diselenolo[3,4-b]quinoline. **Journal of Organometallic Chemistry**, n.695, p.1065-1068, 2010.

BISAZ, R.; BOADAS-VAELLO, P.; GENOUX, D.; SANDI, C. Age-related cognitive impairments in mice with a conditional ablation of the neural cell adhesion molecule. **Learning & Memory**, v.20, n.4, p.183-193, 2013.

BOAVENTURA, G. T. Biodisponibilidade de selênio da dieta regional urbana de Mato Grosso. 1991. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

BORGES, L.P.; NOGUEIRA, C.W.; PANATIERI, R.B.; ROCHA, J.B.; ZENI G.A. Acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats: effect of diphenyl

diselenide on antioxidant defenses. **Chemical Biological Interactions**, v.160, p.99-107, 2006.

BORTOLATTO, C. F.; GUERRA SOUZA, A. C.; WILHELM, E. A.; NOGUEIRA, C. W. Acute Treatment with Bis Selenide, an Organic Compound Containing the Trace Element Selenium, Prevents Memory Deficits Induced by Reserpine in Rats. **Biological Trace Element Research**, v.151(1), p.92-99, 2013.

BORTOLATTO, C.F.; WILHELM, E.A.; CHAGAS, P.M.; NOGUEIRA, C.W. p-Chloro-diphenyl diselenide, an organoselenium compound, with antidepressant-like and memory enhancer actions in aging male rats. **Biogerontology**, v.13, p.237-249, 2012.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Contagem populacional. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>

BRITO, V.B.; ROCHA, J.B.; FOLMER, V.; Erthal, F. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice. **Acta Biochimica Polonica**, v.56, p.125-34, 2009.

BROOK, G. A.; HOUWELING, D. A.; GIELING, R. G.; et al. Attempted endogenous tissue repair following experimental spinal cord injury in the rat. Involvement of cell adhesion molecules L1 and NCAM? **European Journal of Neuroscience**, v.12, p.3224-3238, 2000.

BROWN, C.K.; LOCKWOOD, A.H.; SONAWANE B.R. **Environmental Health Perspectives**, v.113, p.1250-1256, 2005.

BRUEL-JUNGERMAN, E.; DAVIS, S.; LAROCHE, S. Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. **Neuroscientist**, v.5, p.492-505, 2007.

BRÜNING, C. A.; PRIGOL, M.; LUCHESE, C.; JESSE, C. R. et al. Protective effect of diphenyl diselenide on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury: involvement of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. **Neurochemical Research**, v.37, p.2249-2258, 2012.

BRÜNING, C.A.; GAI, B.M.; SOARES, S.M.; MARTINI, F.; NOGUEIRA, C.W. Serotonergic systems are implicated in antinociceptive effect of m-trifluoromethyl diphenyl diselenide in the mouse glutamate test. **Pharmacology and Biochemistry Behavior**, v.125, p.15-20, 2014.

BRÜNING, C.A.; MARTINI, F.; SOARES, S.M.; SAMPAIO, T.B.; GAI, B.M.; DUARTE, M.M.; NOGUEIRA, C.W. m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide, a multi-target selenium compound, prevented mechanical allodynia and depressive-like behavior in a mouse comorbid pain and depression model. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** v.63, p.35-46, 2015.

BRÜNING, C.A.; PRIGOL, M.; LUCHESE, C.; JESSE, C.R.; DUARTE, M.M.; ROMAN, S.S.; NOGUEIRA, C.W. Protective effect of diphenyl diselenide on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury: involvement of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. **Neurochemistry Research**, v.37(10), p.2249-58, 2012.

CAI, Z.; ZHANG, J.; LI, H. Selenium, aging and aging-related diseases. **Aging Clinical and Experimental Research**, 2018. doi:10.1007/s40520-018-1086-7

CANÇADO, F.A.X.; HORTA, M.L. Envelhecimento cerebral. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.112-127, 2002.

CARDOSO, B.R.; et al. Nutritional status of selenium in Alzheimer's disease patients. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.103, n.6, p. 803-806, 2010.

CARVALHO FILHO, E.T.; PAPALÉO NETTO, M. Geriatria: fundamentos, clínica e terapêutica. 2ª ed. São Paulo (SP): **Atheneu**, 2006.

CEBALLOS-PICOTT, et al. Peripheral antioxidant enzyme activities and selenium in elderly subject and in dementia of Alzheimer's type-place of the extracellular glutathione peroxidase. **Free Radical Biology Medicinal**, v.20, p.579-587, 1996.

CECHELLA, J.L.; LEITE, M.R.; ROSARIO, A.R.; SAMPAIO, T.B.; ZENI, G. Diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise enhance novel object recognition memory in old rats. **Age**, v.36, p.9666, 2014.

CENTURIAO, F.B.; CORTE, C.L.; PAIXAO, M.W.; BRAGA, A.L.; ZENI, G.; EMANUELLI, T.; ROCHA, J.B. Effect of ebselen and organochalcogenides on excitotoxicity induced by glutamate in isolated chick retina. **Brain Research**, v.1039, p.146-152, 2005.

CESPÓN, J.; MINIUSSIA, C.; PELLICCIARIA, M.C. Interventional programmes to improve cognition during healthy and pathological ageing: Cortical modulations and evidence for brain plasticity. **Ageing Research Reviews**, v.43, p.81-98, 2018.

CHAGAS, P.M.; FULCO, B.C.W.; PESARICO, A.P.; ROEHRS, J.A.; NOGUEIRA, C.W. Bis (phenylimidazoselenazoly) diselenide as an antioxidant compound: an *in vitro* and *in vivo* study. **Chemico-Biological Interactions**. v.233, p. 14-24, 2015.

CHAIYASIT0 W.; ELIAS, R.J.; MCCLEMENTS, D.J., DECKER E.A. Role of Physical Structures in Bulk Oils on Lipid Oxidation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, p.299-317, 2007.

CHARLES, P.; HERNANDEZ, M.P.; STANKOFF, B.; AIGROT, M.S.; COLIN, C.; ROUGON, G.; et al. Negative regulation of central nervous system

myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.97, p.7585-7590, 2000.

CHAUDHARY, A.K. et al. Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. **Science**, v. 265, n. 5178, p. 1580-1582, 1994

CHEN, J.; BERRY, M. J. Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, n.1, 1-12, 2003.

CHUNG, P. Y; BIAN, Z. X.; PUN, H. Y.; CHAN, D.; CHAN, A. S. C.; CHUI, C. H.; TANG, J C. O.; LAM, K. H. Recent advances in research of natural and synthetic bioactive quinolines, **Future Medicinal Chemistry**. v. 7, p. 947-967, 2015.

COLES, E.H. Veterinary Clinical Pathology. 4th ed. W.B. Saunders, Philadelphia, p.486, 1986.

CORDNER, Z.A.; TAMASHIRO, K.L. Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. **Physiology behavior**, v.152, p.363-371, 2015.

CUNY, G. D; ROBIN, M; ULYANOVA, N. P.; PATNAIK, D.; PIQUE, V.; CASANO, G.; LIU, J-F.; LIN, X.; XIAN, J.; GLICKSMAN, M.A. Structure-activity relationship study of acridine analogs as haspin and DYRK2 kinase inhibitors, **Bioorganic & medicinal chemistry letters**. v. 20, p. 3491-3494, 2010.

DA SILVA, W. C.; BONINI, J. S.; BEVILAQUA, L. R.; MEDINA, J. H.; IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M. Inhibition of Mrna synthesis in the hippocampus impairs consolidation and reconsolidation od spatial memory. **Hippocampus**, v.18, n.1, p.29-39, 2008.

DALLA CORTE, C.L.; BASTOS, L.L.; DOBRACHINSKI, F.; ROCHA, J.B.; SOARES, F.A. The combination of organoselenium compounds and

guanosine prevents glutamate-induced oxidative stress in different regions of rat brains. **Brain Research**, v.1430, p.101-11, 2012.

DAS A, DIKSHIT M, NATH C Profile of acetylcholinesterase in brain areas of male and female rats of adult and old age. **Life Science**, v.68, p.1545-1555, 2001.

DAWSON D. A.; MASAYASU H.; GRAHAM D. I.; MACRAE I. M. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. **Neuroscience Letters**, v.185, p.65-69, 1995.

DE FREITAS COUTO, S., ARAUJO S.M.; BORTOLOTTI, V.C.; POETINI, M.R.; PINHEIRO, F.C.; SANTOS MUSACHIO, E.A.; MEICHTRY, L.B., DO SACRAMENTO, M.; ALVES D.; LA ROSA NOVO, D.; MESKO, M.F.; PRIGOL, M. 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline prevents dopamine depletion in a *Drosophila melanogaster* model of Parkinson's-like disease. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 2018. doi: 10.1016/j.jtemb.2018.10.015.

DE FREITAS, A.S.; ROCHA, J.B. Diphenyl diselenide and analogs are substrates of cerebral rat thioredoxin reductase: a pathway for their neuroprotective effects. **Neuroscience Letters**, v.503(1), p.1-5, 2011.

DE FRIAS, C. M.; BUNCE, D.; WAHLIN, Å.; ADOLFSSON, R.; SLEEGERS, K.; CRUTS, M.; NILSSON, L. G. Cholesterol and triglycerides moderate the effect of apolipoprotein E on memory functioning in older adults. **Journal of Gerontology Ser B Psychology Science Society Sci**, v.62(2), p.112- P118, 2007.

DE LIMA, M. N.; LARANJA, D. C.; CALDANA, F.; et al. Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. **Experimental Gerontology**, v.40(6), p.506 – 511, 2005.

DE OLIVEIRA, J.; MOREIRA, E.L.; MANCINI, G.; HORT, M.A.; LATINI, A.; RIBEIRO-DO-VALLE, R.M.; FARINA, M.; DA ROCHA, J.B.; DE BEM, A.F. Diphenyl diselenide prevents cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by hypercholesterolemia in LDL receptor knockout mice. *Neurochemistry Research*, v.38(10), p.2028-36, 2013.

DE SOUZA-PINTO, N. C.; BOHR, V. A. The mitochondrial theory of aging: Involvement of mitochondrial DNA damage and repair. **Mitochondrial Function and Dysfunction**, 519-534, 2002.

DE VITTA, A. Atividade física e bem-estar na velhice. In A.L. Neri e S.A.Freire. (orgs.), **E por falar em boa velhice** . Campinas, SP: Papirus, p.25-38, 2000.

DEAN, R.T. et al. Hypothesis: a damaging role in aging for reactive protein oxidation products? **Mutation Research**, v. 275, n. 3-6, p. 387-393, 1992.

DEIANA, S. et al. The cholinergic system and spatial learning. **Behavioural Brain Research**, v. 221, p. 389-411, 2011.

DEL PARIGI, A.; et al. Nutritional factors, cognitive decline, and dementia, Review. **Brain Research Bulletin**, v. 69, n.1, p.1-19, 2006.

DEMIRCI, K.; NAZIROĞLU, M.; ÖVEY, İ. S.; BALABAN, H. Selenium attenuates apoptosis, inflammation and oxidative stress in the blood and brain of aged rats with scopolamine-induced dementia. **Metabolic Brain Disease**, v.32(2), p.321-329, 2016.

DIAS, G.R.; VIEIRA, F.A.; DOBRACHINSKI, F.; BRIDI, J.C.; BALK, R.D.E. S.; SOARES, F.A.; NOGUEIRA, C.W.; BARBOSA, N.B. Diphenyl diselenide diet intake improves spatial learning and memory deficits in hypothyroid female rats. **International Journal of Neuroscience**, v.30(2), p.83-9, 2012.

DOBRACHINSKI, F.; DA SILVA, M.H.; TASSI, C.L.; DE CARVALHO, N.R.; DIAS, G.R.; GOLOMBIESKI, R.M.; DA SILVA LORETO, E.L.; DA ROCHA, J.B.; FIGHERA, M.R.; SOARES, F.A. Neuroprotective effect of diphenyl diselenide in a experimental stroke model: maintenance of redox system in mitochondria of brain regions. **Neurotoxicology Research**, v.26(4), p.317-30, 2014.

DORI, A.; COHEN, J.; SILVERMAN, W.F.; POLLACK, Y.; SOREQ, H. Functional manipulations of acetylcholinesterase splice variants highlight alternative splicing contributions to murine neocortical development. **Cerebral Cortex**, v.15, p.419-430, 2005.

DOUCHA, J.; LÍVANSKY, K.; KOTRBÁČEK, V.; ZACHLEDER, V. Production of Chlorella biomass enriched by selenium and its use in animal nutrition: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.83, p.1001-8, 2009.

DREW, B.; LEEUWENBURGH, C. Aging and the role of reactive nitrogen species. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 959, p. 66-81, 2002.

DUARTE, L. F. B.; BARBOSA, E. S.; OLIVEIRA, R. L.; . PINZ , M. P. ; GODOI, B.; SCHUMACHER, R. F.; LUCHESE C.; WILHELM , E. A.; ALVES, D. A simple method for the synthesis of 4-arylselanyl-7-chloroquinolines used as in vitro acetylcholinesterase inhibitors and in vivo memory improvement. **Tetrahedron Letters**, v. 58, p. 3319-3322, 2017.

DURIEUX, J.; WOLFF, S.; DILLIN, A. The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. **Cell**, v.144, p.79-91, 2011.

EACOTT, M.J.; NORMAN, G. Integrated memory for object, place, and context in rats: a possible model of episodic-like memory? **Journal of Neuroscience**, v.24, p.1948-53, 2004.

EMSLEY, J. Nature's building blocks: an A-Z guide to the elements. **Oxford University Press**. Oxford, 2011.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. **Behavioral Brain Research**, v.31, p.47-59, 1988.

FAIVRE-SARRAILH, C.; BANERJEE, S.; LI, J.; HORTSCH, M.; LAVAL, M.; BHAT, M.A. Drosophila contactin, a homolog of vertebrate contactin, is required for septate junction organization and paracellular barrier function. **Development**, v.131, p.4931-4942, 2004.

FARMER, K.J.; SOHAL, S. Relationship between superoxide anion radical generation and aging in the housefly, *Musca domestica*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 7, p.23-29, 1989.

FARR, S.A.; YAMADA, K.A.; BUTTERFIELD, D.A.; ABDUL, H.M.; XU, L.; MILLER, N.E.; BANKS, W.A.; MORLEY, J.E. Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment. **Endocrinology**, v.149, p.2628-36, 2008.

FAVARO, D.I, et al. Determination of various nutrients and toxic elements in different Brazilian regional diets by neutron activation analysis. **Journal of Trace Elements and Medical Biology**, v.11, p. 129-36, 1997.

FERREIRA-VIEIRA, T. H. et al. Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system. **Current neuropharmacology**, v.14, p. 101-115, 2016.

FERRI, C. P.; et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. **Lancet**, v.366, n.9503, p. 2112-2117, 2005.

FINLEY, J.W. Bioavailability of selenium from foods. **Nutrition Journal**, v.64, p.146-51, 2006.

FRAGA, A.S. Acetilcolinesterase, butirilcolinesterase, carboxilesterase e a resistência de peixes neotropicais aos pesticidas organofosforados. Tese

apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2010.

FRANKEL, E. 2014. Lipid Oxidation. **Elsevier**, 2014. ISBN 0855709792X

FRAZIER, D.T.; BETTCHER, B.M.; DUTT, S.; PATEL, N.; MUNGAS, D.; MILLER, J.; KRAMER, J.H. Relationship between Insulin-Resistance Processing Speed and Specific Executive Function Profiles in Neurologically Intact Older Adults. **Journal of the International Neuropsychological Society**, p.1-7, 2015.

FREI, B. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 9, p. 963-964, 1999.

FRIDLYAND, L.E.; PHILIPSON, L.H. Reactive species, cellular repair and risk factors in the onset of type 2 diabetes mellitus: review and hypothesis. **Current in Diabetes Reviews**, v.2, p.241-259, 2006.

GARCIA, C.C.; POTIAN, J.G.; HOGNASON, K.; THYAGARAJAN, B.; SULTATOS, L.G.; SOUAYAH, N.; ROUTH, V.H.; MCARDLE, J.I. Acetylcholinesterase deficiency contributes to neuromuscular junction dysfunction in type 1 diabetic neuropathy. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, v.303, p.551-E561, 2012.

GARCIA, T. et al. Oxidative stress status and Rna expression in hippocampus of an animal model of Alzheimer's disease after chronic exposure to aluminum. **Hippocampus**, v. 20, n.1, p.218-25, 2009.

GEULA, C.; MESULAM, M.M.; KATZMAN, R.; BICK, K.L.; SISODIA, S.S. Cholinergic systems and the Alzheimer disease. **Alzheimer Disease**, p. 269-292, 1999.

GLASER, V.; MORITZ, B.; SCHMITZ, A.; DAFRÉ, A.L.; NAZARI, E.M.; RAUH MÜLLER, Y.M.; FEKSA, L.; STRALIOTTOA, M.R.; DE BEM, A.F.; FARINA, M.; DA ROCHA, J.B.; LATINI, A. Protective effects of diphenyl diselenide in a

mouse model of brain toxicity. **Chemical Biological Interactions**, v.206(1), p.18-26, 2013.

GRADY, C. Trends in Neurocognitive Aging. **Nature Review in Neuroscience**, v.13, n.7, p. 491-505, 2012.

GROSS, L.S.; LI, L.; FORD, E.S.; LIU, S. Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.774-779, 2004.

GUBKINA, O.; CREMER, H.; ROUGON, G. Mutation in the neural cell adhesion molecule interferes with the differentiation of anterior pituitary secretory cells. **Neuroendocrinology**, v.74, p.335-346, 2001.

GUIDELINES FOR DRINKING-WATER QUALITY
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/seleniumsum.pdf

GULISANO, W.; BIZZOCA, A.; GENNARINI, G.; PALMERI, A.; PUZZO, D. Role of the adhesion molecule F3/Contactin in synaptic plasticity and memory. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v.81, p.64-71, 2017.

GUNES, S.; SAHINTURK, V.; USLU, S.; AYHanci, A.; KACAR, S.; UYAR, R. Protective Effects of Selenium on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress and Kidney Injury. **Biological Trace Element Research**, v.185(1), p.116-123, 2017.

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

HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v.11, p.298-300, 1956.

HARMAN, D. The aging Process. **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.78(11), p.7124-8, 1981.

HARRIS, J.B.; BLAIN, P.G. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v.3, p.29-34, 2004.

HEBERT, L.E. Age-specific incidence of Alzheimer's disease in a community population. **JAMA Psychiatry**, v.273, p.1354-59, 1995.

HENRIQUES, L.C.S.; GREGORY, L.; RIZZO H.; HASEGAWA G.; MEIRA J.R. Avaliação dos fatores etários sobre a função renal de ovelhas Santa Inês. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36(7), p.642-646, 2016.

HOFER, S.M.; BERG, S.; ERA, P. Evaluating the interdependence of aging-related changes in visual and auditory acuity, balance, and cognitive functioning. **Psychology Aging**, v.18, p.285-305, 2003.

IBRAHIM, M; HASSAN, W; MEINERZ, D. F.; LEITE. G. O.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Ethanol-Induced Oxidative Stress: The Role of Binaphthyl Diselenide as a Potent Antioxidant. **Biological Trace Element Research**, v. 147, p. 309-314, 2012.

IMAI, H.; GRAHAM, D.I.; MASAYASU, H.; MACRAE, I.M. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. **Free Radical Biology and Medicine** v.34, p.56-63, 2003.

INESTROSA, N.C.; ALVAREZ, A.; PEREZ, C.A.; MORENO, R.D.; VICENTE, M.; LINKER, C.; CASANUEVA, O.I.; SOTO, C.; GARRIDO, J. Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid-beta peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. **Neuron**, v.16, p.881-891, 1996.

INESTROSA, N.C.; DINAMARCA, M.C.; ALVAREZ, A. Amyloid-cholinesterase interactions. Implications for Alzheimer's disease. **FEBS Journal**, v.275, p.625-

632, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Síntese de Indicadores Sociais Uma análise das condições de vida da população brasileira 2016**, Rio de Janeiro, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Projeções da população, revisão 2018**. Rio de Janeiro, 2016.

ISHRAT, T.; PARVEEN, K.; KHAN, M.M.; et al. Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's disease. **Brain Research**, v.1281, p.117-127, 2009.

IZQUIERDO, I.; IZQUIERDO, L. A.; BARROS, D. M.; MELLO, T.; SOUZA, E. et al. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short-term and long-term memory. **Behavioral Pharmacology**, v.9(5-6), p.421-7, 1998.

IZQUIERDO, L.; et al. Construction and reconstruction of memories. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, p.9-25, 1988.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L. R.; ROSSATO, J. I.; BONINI, J. S.; MEDINA, J. H.; CAMMAROTA, M. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. **Trends in Neuroscience**, v.29(9), p.496-505, 2006.

IZQUIERDO, I.; VIANNA, M.R.; IZQUIERDO, L.A.; BARROS, D.M.; et al. Memory retrieval and its lasting consequences. **Neurotoxicology Research**, v.4, n.5-6, p.573-593, 2002.

JAKOVCEVSKI, I.; MO, Z.; ZECEVIC, N. Down-regulation of the axonal polysialic acid-neural cell adhesion molecule expression coincides with the

onset of myelination in the human fetal forebrain. **Neuroscience**, v.149, p.328-337, 2007.

JIANG, H.; ZHANG, X.J. Acetylcholinesterase and apoptosis: A novel perspective for an old enzyme. **FEBS Journal**, v.275, p.612-617, 2008.

JIMENEZ, M.H. et al. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. **INCI**. v. 30, n. 12, p. 728-734, 2005.

KALAYCI, M.; COSKUN, O.; CAGAVI, F.; KANTER, M.; ARMUTCU, F.; GUL, S.; ACIKGOZ, B. Neuroprotective effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats. **Neurochemistry Research**, v.30, p.403-410, 2005.

KANDA, T.; ENGMAN L.; COTGREAVE, I. A.; POWIS G. Novel water-soluble diorganyl tellurides with thiol peroxidase and antioxidant activity. **The Journal of Organic Chemistry**, v.64, p.8161 – 8169, 1999.

KANDEL, E. R. Genes, Synapses, and Long-Term Memory. **Journal of Cellular Physiology**, v.173, p.124-125, 1997.

KARVAT, G.; KIMCHI, T. Acetylcholine Elevation Relieves Cognitive Rigidity and Social Deficiency in a Mouse Model of Autism. **Neuropsychopharmacology**, v.39, p.831-840, 2014.

KAUR, K.; JAIN, M.; REDDY, R.P.; JAIN, R. Quinolines and structurally related heterocycles as antimalarials. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.45, p.3245-3264, 2010.

KILIMANN, I.; HAUSNER, L.; FELLGIEBEL, A.; FILIPPI, M.; WURDEMANN, T.J.; HEINSEN, H.; TEIPEL, S.J. Parallel Atrophy of Cortex and Basal Forebrain Cholinergic System in Mild Cognitive Impairment. **Cerebral Cortex**, v.27, p.1841-1848, 2017.

KIRYUSHOKO, D.; KORSHINOVA, I.; BEREZIUS, V.; BOCK, E. Neural cell adhesion molecule induces intracellular signaling via multiple mechanisms of Ca²⁺ homeostasis. **Molecular Biological Cell**, v.17, p.2278-86, 2006.

KISELYOV, V.; SOROKA, V.; BEREZIN, V.; BOCK, E. Structural biology of NCAM homophilic binding and activation of FGFR. **Journal of Neurochemistry**, v.94, p.1169-79, 2005.

KLOPPENBORG, R.P.; VAN DEN BERG, E.; KAPPELLE, L.J.; BIESSELS, G.J. Diabetes and other vascular risk factors for dementia: which factor matters most? A systematic review. **European Journal of Pharmacology**, v.585(1), p.97-108, 2008.

KOENIGSBERGER, C.; CHIAPPA, S.; BRIMIJOIN, S. Neurite differentiation is modulated in neuroblastoma cells engineered for altered acetylcholinesterase expression. **Journal of Neurochemistry**, v.69, p.1389-1397, 1997.

KOZLOWSKI H.; LUCZKOWSKI M.; REMELLI M.; VALENSIN D. **Coordination Chemistry Reviews**, v.256, p.2129-2141, 2012.

LEAL, S.S.; BOTELHO, H.M.; GOMES, C.M. **Coordination Chemistry Reviews**, v.256, p.2253-2270, 2012.

LEE, L. J.; LO, F. S.; ERZURUMLU, R. S. NMDA Receptor-Dependent Regulation of Axonal and Dendritic Branching. **Journal of Neuroscience**, v.25(9), p.2304-2311, 2005.

LEGRAIN, Y.; TOUAT-HAMICI, Z.; CHAVATTE, L. Interplay between selenium levels, selenoprotein expression, and replicative senescence in WI-38 human fibroblasts. **Journal of Biology Chemistry**, v.289, p.6299-6310, 2014.

LEITE, M.R.; CECHELLA, J.L.; PINTON, S.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. A diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise promote

neuroprotection, reduced cell apoptosis and glial cell activation in the hypothalamus of old rats. **Experimental Gerontology**, v.82, p.1-7, 2016.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.37, p.293-303, 2001.

LOPES, F.M.; LONDERO, G.F.; DE MEDEIROS, L.M., DA MOTTA, L.L.; BEHR, G.A.; DE OLIVEIRA, V.A.; IBRAHIM, M.; MOREIRA, J.C.; PORCIÚNCULA, L.O.; DA ROCHA, J.B.; KLAMT, F. Evaluation of the neurotoxic/neuroprotective role of organoselenides using differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cell line challenged with 6-hydroxydopamine. **Neurotoxicology Research**, v.22(2), p.138-49, 2012.

LÖVDÉN, M.; BODAMMER, N.C.; KÜHN, S.; KAUFMANN, J.; SCHÜTZE, H.; TEMPELMANN, C.; HEINZE, H.J.; DÜZEL, E.; SCHMIEDEK, F.; LINDENBERGER, U. Experience-dependent plasticity of white-matter microstructure extends into old age. **Neuropsychologia**, v.13, p.3878-83, 2010.

LUCHESI, C.; BRANDAO, R.; OLIVEIRA, R.; NOGUEIRA, C. W.; SANTOS, F. W. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. **Toxicology Letters**, v. 173, p. 181-190, 2007.

LUCHESI, C.; PRIGOL, M.; DUARTE, F.; NOGUEIRA, C. W. Diphenyl diselenide reduces inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan: reduction of pro-inflammatory markers and reactive species levels. **Inflammation Research**, v.10, p.1117-1124, 2012.

LUCHSINGER, J.A.M.R. Cardiovascular risk factors and Alzheimer's disease. **Current in Atherosclerosis Reports**, v.6, p.261-266, 2004.

MANERA, C.; MANERA, C.; CASCIO, M.G.; BENETTI, V.; et al. New 1,8-naphthyridine and quinoline derivatives as CB2 selective agonists. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.17, p.6505-6510, 2007.

MAPSTONE, M.; CHEEMA, A.K.; FIANDACA, M.S.; ZHONG, X.; MHYRE, T.R.; MACARTHUR, L.H.; FEDEROFF, H.J. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. **Nature Medicine**, v.20, n.4, p.415-8, 2014.

MARELLA, A.; TANWAR, O.P.; SAHA, R.; ALI, M. R.; SRIVASTAVA, S.; AKHTER, M.; SHAQUIQUZZAMAN, M.; ALAM, M.M. Quinoline: A versatile heterocyclic. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.21(1), p.1-12, 2012.

MARTINI, F.; BRUNING, C.A.; SOARES, S.M.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Inhibitory effect of ebselen on cerebral acetylcholinesterase activity in vitro: kinetics and reversibility of inhibition. **Current Pharmaceutical Desing**, v.21(7), p.920-4, 2015.

MARTINI, F.; PESARICO, A.P.; BRÜNING, C.A.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C.W. Ebselen inhibits the activity of acetylcholinesterase globular isoform G4 in vitro and attenuates scopolamine-induced amnesia in mice. **Journal of Celular Biochemistry**, v.119(7), p.5598-5608, 2018.

MARTINS, I.J.; BERGER, T.; SHARMAN, M.J.; VERDILE, G.; FULLER, S.J.; MARTINS, R.N. Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Journal of Neurochemistry**, v.111, p.1275-1308, 2009.

MASILAMONI, J.G.; JESUDASON, E.P.; DHANDAYUTHAPANI, S.; ASHOK, B.S.; VIGNESH, S.; JEBARAJ, W.C.E.; PAUL, S.F.D.; JAYAKUMAR, R. The neuroprotective role of melatonin against amyloid β peptide injected mice. **Free Radical Research**, v.42, p.661-673, 2008.

MASUMOTO, H.; SIES, H. The reaction of ebselen with peroxynitrite. **Chemical Research in Toxicology**, v.9, p.262-267, 1996.

MATSUMOTO, K.; UI, I.; SATOH, K.; TOBE, T.; USHIO, F.; ENDO, K. Evaluation of oxidative damage in the liver of selenium-deficient rats. **Redox Report**, v.7(5), p.351-354, 2002.

MCARDLE, A.; VASILAKI, A.; JACKSON, M. Exercise and skeletal muscle ageing: cellular and molecular mechanisms. **Ageing Research Reviews**, v. 1, n. 1, p. 79-93, 2002.

MCKENZIE, R.C.; ARTHUR, J.R.; BECKETT, G.J. Selenium and the regulation of cell signaling, growth, and survival: molecular and mechanistic aspects. **Antioxidant Redox Signaling**, v. 4, n. 2, p.339-51, 2002.

MEINERZ, D.F.; DE PAULA, M.T.; COMPARSI, B.; et al. Protective effects of organoselenium compounds against methylmercury-induced oxidative stress in mouse brain mitochondrial-enriched fractions. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v.44(11), p.1156-63, 2011.

MEOTTI, F.C.; STANGHERLIN, E.C.; NOGUEIRA, C.W.; ROCHA, J.B.T. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environmental Research**, v. 94, p. 276-282, 2004.

MESHORER, E.; BRYK, B.; TOIBER, D.; COHEN, J.; PODOLY, E.; DORI, A.; SOREQ, H. SC35 promotes sustainable stress-induced alternative splicing of neuronal acetylcholinesterase mRNA. **Molecular Psychiatry**, v.10, p.985-997, 2005.

MESULAM, M.M. Neuroplasticity failure in Alzheimer's disease: bridging the gap between plaques and tangles. **Neuron**, v.24, p.521-9, 1999.

MICHALKE, B.; NISCHWITZ, V. **Analytica chimica acta**, p.682, p.23-36, 2010.
MINELLI, A. et al. Oxidative stress-related aging: A role for prostate cancer? **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1795, n. 2, p. 83-91, 2009.

MOLTENI, R.; BARNARD, R.J.; YING, Z.; ROBERTS, C.K.; GÓMEZ-PINILLA, F. A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. **Neuroscience**, v.112, p.803-14, 2002.

MONTENEGRO, R. C.; LOTUFO, L. V.; DE MORAES, M. O.; et al. Synthesis and antitumoral evaluation of 7-chloro-4-quinolinyldrazones derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.7(6), p.599-604, 2011.

MORRISON, C.D.; PISTELL, P.J.; INGRAM, D.K.; JOHNSON, W.D.; LIU, Y.; et al. High fat diet increases hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in aged mice: implications for decreased Nrf2 signaling. **Journal of Neurochemistry**, v.114, p.1581-9, 2010.

MOTA, P.M.; FIGUEIREDO, P.A.; DUARTE, J.A. Teorias biológicas do envelhecimento. **Revista Portuguesa de Ciências do Desporto**, v. 4, n. 1, p. 81-110, 2004.

MULLER, A.; CADENAS, E.; GRAF, P.; SIES, H. A novel biologically active selenoorganic compound--I. Glutathione peroxidase-like activity in vitro and antioxidant capacity of PZ 51 (Ebselen). **Biochemical Pharmacology**, v. 33, p. 3235-3239, 1984.

NAIK, H. R.; NAIK H., S.; NAIK, T. R.; NAIKA, H. R.; GOUTHAMCHANDRA, K.; MAHMOOD, R.; AHAMED, B.M. Synthesis of novel benzo[h]quinolines: Wound healing, antibacterial, DNA binding and in vitro antioxidant activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44(3), p.981-989, 2009.

NAMURA, S.; NAGATA, I.; TAKAMI, S.; MASAYASU, H.; KIKUCHI, H. Ebselen reduces cytochrome c release from mitochondria and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. **Stroke**, v.32, p.1906-1911, 2001.

NASEER, M.; FORSSELL, H.; FAGERSTRÖM, C. Malnutrition, functional ability and mortality among older people aged ≥ 60 years: a 7-year longitudinal study. **European Journal Clinical Nutrition**, v.70, p.399-404, 2016.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. NCI Drug Dictionary.
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/irinotecan-hydrochloride>

NAZIROGLU, M. Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-Induced Molecular Pathways in Epilepsy. **Neurochemistry Research**, v.34, n.12, p.2181-91, 2009.

NIZZARI, M.; THELLUNG, S.; CORSARO, A. Neurodegeneration in Alzheimer Disease: Role of Amyloid Precursor Protein and Presenilin 1 Intracellular Signaling. **Journal of Toxicology**, 2012:187297e306.

NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 104, p. 6255-6285, 2004.

NOWAK, P.M.; SALUK-JUSZCZAK, J.; OLAS, B.; KOLODZIEKCZYK, J.; WACHOWICZ, B. The protective effects of selenoorganic compounds against peroxynitrite-induced changes in plasma proteins and lipids. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 11, p. 1-11, 2006.

NÚÑEZ-SELLÉS, A.J. Antioxidant Therapy: Myth or Reality? **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 699-710, 2005.

NYBERG, L.; et al. Memory aging and brain maintenance. **Trends in Cognition and Science**, v.16, n.5, p. 292-305, 2012.

OFEN, N.; CHAI, X. J.; SCHUIL, K. D.; WHITFIELD, S.; GABRIELI, J. D. The development of brain systems associated with successful memory retrieval of scenes. **Journal of Neuroscience**, v.29, p.10012-20, 2012.

OGAWA, A.T.; YOSHIMOTO, H.; KIKUCHI, K.; et al. Ebselen in Acute Middle Cerebral Artery Occlusion: A Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial. **Cerebrovascular diseases**, v.2, p.112-118, 1999.

OHKAWA, H., OHISHI, H., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, C. E. S.; SARI, M. H. M.; ZBOROWSKI, V. A.; ARAUJO, P. C. O.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G. p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide elicits an antidepressant-like effect in mice without discontinuation anxiety phenotype. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.154, p.31-38, 2017.

OLTMANN-NORDEN, I.; GALUSKA, S.P.; HILDEBRANDT, H.; GEYER, R.; GERARDY-SCHAHN, R.; GEYER, H.; MUHLENHOFF, M. Impact of the polysialyltransferases ST8Siall and ST8SiaIV on polysialic acid synthesis during postnatal mouse brain development. **Journal of Biology Chemistry**, v.283, p.1463-1471, 2008.

OLUKIRAN, S.O.; AKOMOLAFE, R.O.; IIESANMI, O.S.; IMAFIDON, C.E.; ALABI, Q.K. Age-related changes in urinary protein excretion in relation to indices of renal function in Wistar rats. **Animal Models and Experimental Medicine**, v.1(4), p.295-304, 2018.

ONUKE, J.; TEIXEIRA, P.C.; MEDEIROS, M.H.G.; DI MASCIO, E.P. Danos ao dna promovidos por ácido 5-aminolevulínico: possível associação com o desenvolvimento de carcinoma hepatocelular em portadores de porfiria aguda intermitente. **Química Nova**, v.25(4), p.594-608, 2002.

PALANIYAPPAN, A.; ALPHONSE, R. Immunomodulatory effect of DL- α -lipoic acid in aged rats. **Experimental Gerontology**, v.46, p.709-15, 2011.

PAPP, L.V.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K.K. Selenium and selenoproteins in health and disease. **Antioxid Redox Signal**. v.12, n.7, p. 93-5, 2010.

PAPP, L.V.; HOLMGREN, A.; KHANNA, K.K. Selenium and selenoproteins in health and disease. **Antioxidant and Redox Signaling**, v.12, n.7, p. 93-5, 2010.

PARADIES, G.; PETROSILLO, G.; PARADIES, V.; RUGGIERO, F. M. Mitochondrial dysfunction in brain aging: role of oxidative stress and cardiolipin. **International Neurochemistry**, v.58(4), p.447-57, 2011.

PARADIS, E.; CLAVEL, S.; JULIEN, P.; MURTHY, M.R.; DE BILBAO, F.; ARSENIJEVIC, D.; GIANNAKOPOULOS, P.; VALLET, P.; RICHARD, D. Lipoprotein lipase and endothelial lipase expression in mouse brain: Regional distribution and selective induction following kainic acid induced lesion and focal cerebral ischemia. **Neurobiology Disease** v.15, p.312-325, 2004.

PARDON, M.; PÉREZ-DIAZ, F.; JOUBERT, C.; COHEN-SALMON, C. Age-dependent effects of a chronic ultramild stress procedure on open-field behaviour in B6D2F1 female mice. **Physiological Behaviour**, v.70, n.1-2, p.7-13, 2000.

PARNHAM, M.J.; GRAF E. Pharmacology of synthetic organic selenium compounds. **Progress in Drug Research**, v.36, p.10 – 47, 1991.

PILLAI, R.; UYEHARA-LOCK, J.H.; BELLINGER F.P. **IUBMB life**, 66 (2014) 229-239.

PIÑEIRO-CARRERO, V.M.; PIÑEIRO, E.O. Liver. **Pediatrics**. v.113(4 Suppl), p.1097-106, 2004.

PINTON, S.; BRÜNING, C. A.; SARTORI OLIVEIRA, C. E., PRIGOL, M., & NOGUEIRA, C. W. Therapeutic effect of organoselenium dietary supplementation in a sporadic dementia of Alzheimer's type model in rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.24(1), p.311-317, 2013.

PINTON, S.; DA ROCHA, J.T.; GAI, B.M.; PRIGOL, M.; DA ROSA, L.V.; NOGUEIRA, C.W. Neuroprotector effect of p,p'-methoxyl-diphenyl diselenide in a model of sporadic dementia of Alzheimer's type in mice: contribution of antioxidant mechanism. **Cell Biochemistry Function**, v.29(3), p.235-43, 2011.

PINTON, S.; SAMPAIO, T.B.; RAMALHO, R.M.; RODRIGUES, C.M.; NOGUEIRA, C.W. p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide prevents neurodegeneration and glial cell activation induced by streptozotocin in rats. **Journal of Alzheimers Disease**, v.33(1), p.133-44, 2013.

PINTON, S.; SOUZA, A.C.; SARI, M.H.; RAMALHO, R.M.; RODRIGUES, C.M.; NOGUEIRA, C.W. p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide protects against amyloid- β induced cytotoxicity in vitro and improves memory deficits in vivo. **Behavior Brain Research**, v.247, p.241-7, 2013.

PINZ, M.; SCHIAVON, A.; DUARTE, V. et al. 4-phenylselenyl-7 chloroquinoline, a new quinoline derivative containing selenium, has potential antinociceptive and anti-inflammatory actions. **European Journal of Pharmacology**, v.780, p.122-128, 2016.

PINZ, M.P.; DOS REIS, A.S.; VOGT, A.G.; KRÜGER, R.; ALVES, D.; JESSE, C.R.; ROMAN, S.S.; SOARES, M.P.; WILHELM EA, LUCHESE C. Current advances of pharmacological properties of 7-chloro-4-(phenylselenyl) quinoline: Prevention of cognitive deficit and anxiety in Alzheimer's disease model. **Biomedicine Pharmacotherapy**, v. 105, p.1006-1014, 2018.

PORCIÚNCULA, L.O.; ROCHA, J.B.T.; GHISLENI, G.; TAVARES, R.G.; SOUZA, D.O. The effects of ebselen on [^3H]glutamate uptake by synaptic vesicles from rat brain. **Brain Research**, v. 1027, p. 192-195, 2004.

POSSER, T.; FRANCO, J.L.; DOS SANTOS, D.A.; RIGON, A.P.; FARINA, M.; DAFRÉ, A.L.; TEIXEIRA ROCHA, J.B.; LEAL, R.B. Diphenyl

diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. **Brain Research**, v.1199, p.138-47, 2008.

PRIGOL, M.; LUCHESE, C.; NOGUEIRA, C. W. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative stress caused by acute physical exercise in skeletal muscle and lungs of mice. **Cell Biochemistry and Function**, v.27, p.216-222, 2009.

PUZZO, D.; ARANCIO, O. Amyloid- β peptide: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? **Journal of Alzheimers Disease**, v.33, p.111-20, 2015.

RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.100, n.4, p.238-53, 2008.

RAYMAN, M.P. Selenium and human health. **The Lancet**, v.379, p.1256-1268, 2012.

REIS, A.S.; PINZ, M.; DUARTE, L.F.; ROEHRS, J.A.; ALVES, D.; LUCHESE C.; WILHELM E.A. 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline, a novel multitarget compound with anxiolytic activity: Contribution of the glutamatergic system. **Journal of Psychiatry Research**. v.84, p.191-199, 2017.

REYES, A.A.; SMALL, S.J.; AKESON, R. At least 27 alternatively spliced forms of the neural cell adhesion molecule mRNA are expressed during rat heart development. **Molecular and Cellular Biology**, v.11, p.1654-61, 1991.

RICHTER, N.; MICHEL, A.; ONUR, O.A.; KRACHT, L.; DIETLEIN, M.; TITTEMEYER, M.; NEUMAIER, B.; FINK, G.R.; KUKOLJA, J. White matter lesions and the cholinergic deficit in aging and mild cognitive impairment. **Neurobiology of Aging**, v.53, p.27-35, 2017.

RÖNNLUND, et al. Stability, growth, and decline in adult life span development of declarative memory: cross-sectional and longitudinal data from a population-based study, **Psychological Aging**, v. 20,n.3, p. 3-18, 2005.

ROSSATO, J. I.; ROSSATO, L. A.; KETZER, F. B.; CENTURIAO, S. J.; N. SILVA, N.; LÜDTKE, D. S.; ZENI, G.; BRAGA, A. L.; RUBIN M. A.; ROCHA, J. B. T. Antioxidant Properties of New Chalcogenides Against Lipid Peroxidation in Rat Brain. **Neurochemical Research**. v. 27, p. 297-303. 2002.

RUTISHAUSER, U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, v.9, p.26-35, 2008.

SALGUEIRO, W.G.; GOLDANI, B.S.; PERES, T.V.; MIRANDA-VIZUETE, A.; ASCHNER, M.; ROCHA, J.B.T.; ALVES, D.; DE ÁVILA, D.S. Insights Into the Differential Toxicological and Antioxidant Effects of 4-phenylchalcogenil-7-chloroquinolines in *Caenorhabditis elegans*. **Free Radical Biology Medicine**, v.110, p.133-141, 2017.

SAMPAIO, T.B.; PINTON, S.; DA ROCHA, J.T.; GAI, B.M.; NOGUEIRA, C.W. Involvement of BDNF/TrkB signaling in the effect of diphenyl diselenide on motor function in a Parkinson's disease rat model. **European Journal of Phamracology**, v.15, p.795:28-35, 2017.

SANTOS, F. W.; ORO, T.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T.; NASCIMENTO, P. C.; NOGUEIRA, C. W. Cadmium induced testicular damage and its response to administration of succimer and diphenyl diselenide in mice. **Toxicology Letters**, v. 152, p. 255-263, 2004.

SANTOS, F. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. T.; NASCIMENTO, P. C.; MARQUES, M. S., NOGUEIRA, C. W. Efficacy of 2,3-dimercapto-1-propanesulfonic acid (DMPS) and diphenyl diselenide on cadmium induced testicular damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 431, p. 723-1730, 2005.

SANTOS, P. I. M. Avaliação da toxicidade aguda do inseticida metomil e o seu efeito sobre a atividade de acetilcolinesterase do peixe Danio rerio. Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Bioecologia aquática da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2009.

SATHYA, M.; MOORTHY, P.; PREMKUMAR, P.; KANDASAMY, M.; JAYACHANDRAN, K.S.; ANUSUYADEVI, M. Resveratrol intervenes in the cholesterol- and isoprenoid-mediated amyloidogenic processing of APP in familial Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimers Disease**, 2016. doi: 10.3233/JAD-161034

SAVEGNAGO, L.; VIEIRA, A.I.; SEUS, N.; GOLDANI, B.S.; CASTRO, M.R.; LENARDÃO, E.J.; ALVES, D. Synthesis and antioxidant properties of novel quinoline-chalcogenium compounds. **Tetrahedron Letters**, v.54, p.40-44, 2013.

SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen--an antiinflammatory antioxidant. **General Pharmacology**, v.26, p.1153-1169, 1995.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behavioural Brain Research**, v.221, n.2, p.555-563, 2011.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 10, n. 4, p.308-313, 2004.

SCHOFIELD, P.W.; FINNIE, S.; YONG, Y.M. The role of olfactory challenge tests in incipient dementia and clinical trial design. **Current Neurology Neuroscience Reports**, v.14, p.479, 2014.

SCHOMBURG, L. Selenium, selenoproteins and the thyroid gland: interactions in health and disease. **National Review of Endocrinology**, v.8, n.3, p.160-71, 2011.

SCHUMACHER, R. F.; ROSARIO, A. R.; SOUZA, A. C. G.; ACKER, C. A.; NOGUEIRA, C. W.; GILSON ZENI, G. The potential antioxidant activity of 2,3-dihydroselenophene, a prototype drug of 4-aryl-2,3-dihydroselenophenes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1418-1425, 2011.

SCHWEIZER, U.; et al. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. **Brain research. Brain Research Reviews**, v. 45, n. 3, p. 164-78, 2004.

SENKOV, O.; SUN, M.; WEINHOLD, B.; GERARDY-SCHAHN, R.; SCHACHNER, M.; DITYATEV, A. Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in induction of longterm potentiation and memory acquisition and consolidation in a fear-conditioning paradigm. **Journal of Neuroscience**, v.26, p.10888-109898, 2006.

SERRA, J.A. et al. Systemic Oxidative Stress Associated with the Neurological Diseases of Aging. **Neurochemical Research**, Jun 2, 2009.

SHARMA, K.V.; KOENIGSBERGER, C.; BRIMIJOIN, S.; BIGBEE, J.W. Direct evidence for an adhesive function in the non cholinergic role of acetylcholinesterase in neurite outgrowth. **Journal of Neuroscience Research**, v.63, p.165-175, 2001.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SILVA, V. D.; REIS, A. S.; PINZ, M.; DA FONSECA, C. A.; DUARTE, L. F. B; ROEHRS, J. A.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E. A. Further analysis of acute antinociceptive and anti-inflammatory actions of 4-phenylselenyl-7-chloroquinoline in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. 2017.

SIQUEIRA, I. R.; CIMAROSTI, H.; FOCHESSATTO, C.; SALBEGO, C.; NETTO, C. A. Age-related susceptibility to oxygen and glucose deprivation damage in rat hippocampal slices. **Brain Research**, v.1025(1-20), p.226-30, 2004.

SIQUEIRA, I. R.; FOCHESSATO, C.; DE ANDRADE, A.; SANTOS, M.; HAGEN, M.; BELLO-KLEIN, A.; NETTO, A. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.23(8), p.663-71, 2005.

SMORGON, C.; et al. Trace elements and cognitive impairment: an elderly cohort study. **Archives of Gerontology Geriatric Supplies**, v.9, n.9, p.393-402, 2004.

SOARES, M.S.P.; OLIVEIRA, P.S.; DEBOM, G.N.; et al. Chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters and ALA-D activity in liver and kidney of young rats. **Amino Acids**, v.49(1), p.129-138, 2016.

SOHAL, R.S. et al. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 15, p.7255-7259, 1993.

SOLOMON, V. R.; LEE, H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. **European Journal of Pharmacology**, v.625(1-3), p.220-233, 2009.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. **Nature Reviews Neuroscience**, v.2, p.294-302, 2001.

SOSA-ORTIZ, A.L.; ACOSTA-CASTILLO, I.; PRINCE, M.J. Epidemiology of dementias and Alzheimer's disease. **Archives Medicinal Research**, v.43, p.600-608, 2012.

SOYSAL, P.; ISIK, A.T.; STUBBS, B.; SOLMI, M.; VOLPE, M.; LUCHINI, C.; D'ONOFRIO, G.; PILOTTO, A.; MANZATO, E.; SERGI, G.; SCHOFIELD, P.; VERONESE, N. Acetylcholinesterase inhibitors are associated with weight loss in older people with dementia: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v.87, n.12, p.1368-1374, 2016.

SPECK-PLANCHE, A.; LUAN, F.; CORDEIRO, M.N. Discovery of anti-Alzheimer agents: current ligand-based approaches toward the design of acetylcholinesterase inhibitors. **Mini Review of Medicinal Chemistry**, v.12, p.583-591, 2012.

STADTMAN, T.C. Selenocysteine. **Revista anual de Bioquímica**.v.65, p.83-100, 1996.

STEVENS, L.A.; LEVEY, A.S. Measurement of kidney function. **Medical Clinics of North America**, v.89(3), p.457-73, 2005.

STOENICA, L.; SENKOV, O.; GERARDY-SCHAHN, R.; WEINHOLD, B.; SCHACHNER, M.; DITYATEV, A. In vivo synaptic plasticity in the dentate gyrus of mice deficient in the neural cell adhesion molecule NCAM or its polysialic acid. **European Journal of Neuroscience**, v.23, p.2255-64, 2006.

STOUGH, C.; PIPINGAS, A.; CAMFIELD, D.; NOLIDIN, K.; SAVAGE, K.; DELEUIL, S.; SCHOLEY, A. Increases in total cholesterol and low density lipoprotein associated with decreased cognitive performance in healthy elderly adults. **Metabolic Brain Disease**, 2019. doi:10.1007/s11011-018-0373-5

STRANAHAN, A.M.; CUTLER, R.G.; BUTTON, C.; TELLJOHANN, R.; MATTSON, M.P. Diet-induced elevations in serum cholesterol are associated with alterations in hippocampal lipid metabolism and increased oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v.118(4), p.611-615, 2011.

STRANAHAN, A.M.; NORMAN, E.D.; LEE, K.; CUTLER, R.G.; TELLJOHANN, R.S.; EGAN, J.M.; MATTSON, M.P. Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. **Hippocampus**, v.18, p.1085-8, 2008.

SUMMERS, S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. **Progress in Lipid Research**, v.45, p.42-72, 2006.

SUTEDJA, N.A.; VELDINK, J.H.; FISCHER, K.; KROMHOUT, H.; HEEDERIK, D.; HUISMAN, M.H., WOKKE, J.H., VAN DEN BERG, L.H. **Amyotrophic Lateral Sclerosis**, 10, p.302-309, 2009.

TONDO, M.; et al. Selenium concentration in cerebrospinal fluid samples from a paediatric population. **Neurochemistry Research**, v. 35, n. 8, p. 1290-1293, 2010.

TORTORA, G.J.; DERRICKSON, B. Princípios de anatomia e fisiologia. Guanabara, v.12, p.409- 915, 2010.

TRUEBA, G.P.; SANCHEZ, G.M.; GIULIANI, A. Oxygen free radical and antioxidant defense mechanism in cancer. **Frontier Bioscience**, v.9, p.2029-44, 2004.

URANGA, R.M.; BRUCE-KELLER, A.J.; MORRISON, C.D.; FERNANDEZ-KIM, S.O.; EBENEZER, P.J.; et al. Intersection between metabolic dysfunction, high fat diet consumption, and brain aging. **Journal of Neurochemistry**, v.114, p.344-61, 2010.

UWANO, C.; SUZUKI, M.; AIKAWA, T.; et al. Rivastigmine dermal patch solves eating problems in an individual with advanced Alzheimer's disease. **Journal of American Geriatric Social**, v.60, p.1979-80, 2012.

VALENTINI, J.; GROTO, D.; PANIZ, C.; ROEHRS, M.; BURG, G.; GARCIA, S.C. The influence of the hemodialysis treatment time under oxidative stress biomarkers in chronic renal failure patients. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.62, p.378-382, 2018.

VANDEKERCKHOVE, S.; D'HOOGHE, M. Quinoline-based antimalarial hybrid compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 23, n. 16, p. 5098-5119, 2015.

VIDAL, C.J. Expression of cholinesterases in brain and nonbrain tumours. **Chemical Biological Interactions**, v.157-158, p.227-232, 2005.

VOGT, A.G.; VOSS, G.T.; DE OLIVEIRA, R.L.; PALTIAN, J.J.; DUARTE, L.F.B.; ALVES, D.; JESSE, C.R.; ROMAN, S.S.; ROEHRS, J.A.; WILHELM, E.A.; LUCHESE, C. Organoselenium group is critical for antioxidant activity of 7-chloro-4- phenylselenyl-quinoline. **Chemico-Biological Interactions**, v. 282, p.7-12, 2018.

von DER OHE, M.; WHEELER, S.F.; WUHRER, M.; HARVEY, D.J.; LIEDTKE, S.; MUHLENHOFF, M., et al. Localization and characterization of polysialic acid-containing N-linked glycans from bovine NCAM. **Glycobiology**, v.12, p.47-63, 2002.

VOSS, G.T.; OLIVEIRA, R.L.; DE SOUZA, J.F.; DUARTE, L.F.B.; FAJARDO, A.R.; ALVES, D.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A. Therapeutic and technological potential of 7-chloro-4-phenylselenyl quinoline for the treatment of atopic dermatitis-like skin lesions in mice. **Materials Science Engineer C – Materials for Biology Applications**, v.84, p.90-98, 2018.

VURAL, H.; et al. Alterations of plasma magnesium, copper, zinc, iron and selenium concentrations and some related erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with Alzheimer's disease. **Journal of Trace Elements Medical Biology**, v.24, n.3,p.169-173, 2010.

WALMOD, P.; KOLKOVA, K.; BEREZIN, V.; BOCK, E. Zippers make signals, NCAMmediated molecular interactions and signal transduction. **Neurochemistry Research**, v.29, p.2015-35, 2004.

WANG, M.; HONGJUN, F.; YONGMEI, X.; et. al. Effects of low-level organic selenium on lead-induced alterations in neural cell adhesion molecules. **Brain Research**, v.1530, p.76-81, 2013

WEINERT B, TIMIRAS P. Invited review: theories of aging. **Journal of Apply Physiology**, v.95, p.1706-1716, 2003.

WILHELM, E. A.; MACHADO, N. C.; PEDROSO, A. B.; GOLDANI, B. S.; SEUS, N.; MOURA, S.; SAVEGNAGO, L.; JACOB, R. G.; ALVES D. Organocatalytic synthesis and evaluation of 7-chloroquinoline-1,2,3-triazoyl carboxamides as potential antinociceptive, anti-inflammatory and anticonvulsant agent. **RSC Advances**, v.78, p.41437-41445, 2014.

World Health Organization. The use of bedaquiline in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis Interim policy guidance, 2012. <https://www.who.int/tb/challenges/mdr/bedaquiline/en/>

World Population Ageing 2015. United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division. Report ST/ESA/SER.A/390 http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf (United Nations, 2015).

XI, H.J.; WU, R.P.; LIU, J.J.; ZHANG, L.J.; LI, Z.S. Role of acetylcholinesterase in lung cancer. **Thoracic Cancer**, v.6, p.390-398, 2015.

YAMAGUCHI, T.; SANO, K.; TAKAKURA, K.; SAITO, I.; SHINOHARA, Y.; ASANO, T.; YASUHARA, H. Ebselen in Acute Ischemic Stroke A Placebo-Controlled, Double-blind Clinical Trial. **Stroke**, v.29, p.12-17, 1998.

YASSUDA, M. S.; BATISTONI, S. S. T.; FORTES, A. G.; Neri, A. L. Treino de memória no idoso saudável: Benefícios e mecanismos. **Psicologia Reflexão e Crítica**, v.19, n.3, p.470-481, 2006.

YASSUDA, M. S.; LASCA, V. B.; NERI, A. L. Meta-memória e auto-eficácia: um estudo de validação de instrumentos de pesquisa sobre memória e envelhecimento. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, v. 18, n. 1, p. 78-90, 2005.

YOUN H.S. et al. Selenium suppresses the activation of transcription factor NF-kappa B and IRF3 induced by TLR3 or TLR4 agonists. **International immunopharmacology**, v.8, n.3, p.495-501, 2008.

YU, B.P. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 5, p. 651-668, 1996.

YUYAMA, L.K.; et al. Determinação dos teores de elementos minerais em alimentos convencionais e não convencionais da região amazônica pela técnica de análise por ativação com nêutrons instrumental. **Acta Amaz**, v.27, n.3, p.183-195,1997.

ZAMROZIEWICZ, et al. Predictors of Memory in Healthy Aging: Polyunsaturated Fatty Acid Balance and Fornix White Matter Integrity. **Aging Disease**, v, 8, n.4, p. 372-383, 2017.

ZHANG, J.; XU, B.; HUANG, X.; GAO, Y.; CHEN, Y.; SHAN, A. Selenium Deficiency Affects the mRNA Expression of Inflammatory Factors and Selenoprotein Genes in the Kidneys of Broiler Chicks. **Biological Trace Element Research**, v.171(1), p.201-207, 2015.

ZHANG, S. ROCOURT, C.; CHENG, W.H. Selenoproteins and the aging brain. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.131, n.4, p.253-260, 2010.

ZHANG, X.J.; GREENBERG, D.S. Acetylcholinesterase involvement in apoptosis. **Frontier Molecular Neuroscience**, v.5, p.40, 2012.

ZHANG, L; SUN, F; LI, Y; SUN, X; LIU, Y. HUANG, L.H. ZHANG, X.S. YE, J. XIAO. Rapid Synthesis of Iminosugar Derivatives for Cell-Based In Situ Screening: Discovery of “Hit” Compounds with Anticancer Activity. **ChemMedChem**. v. 2, p. 1594-1597, 2007.

ANEXO 1.



Pelotas, 13 de junho de 2016

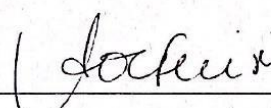
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação do efeito de um derivado de quinolina na melhora da memória em ratos velhos**", registrada com o nº23110.004599/2016-84, sob a responsabilidade de **Cristiane Luchese** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 06/06/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	15/06/2016 a 01/06/2020
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de animais	52
Idade	39 animais com 22 meses e 13 animais com 3 meses
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central - UFPel

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 4599-2016).


M.V. Dra. Anélize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

ANEXO 2.

SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS	
Jul 09, 2019	
This Agreement between Dr. ANELISE BARTH ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.	
License Number	4624881427779
License date	Jul 09, 2019
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Molecular Neurobiology
Licensed Content Title	7-Chloro-4-(Phenylselanyl) Quinoline with Memory Enhancer Action in Aging Rats: Modulation of Neuroplasticity, Acetylcholinesterase Activity, and Cholesterol Levels
Licensed Content Author	Anelise Barth, Ane G. Vogt, Angélica S. dos Reis et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2019
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	full article/chapter
Will you be translating?	No
Circulation/distribution	501 to 1000
Author of this Springer Nature content	Yes
Title	7-Chloro-4-(phenylselanyl) quinoline with memory enhancer actions in ageing rats: Modulation of neuroplasticity, acetylcholinesterase activity and cholesterol levels
Institution name	Universidade Federal de Pelotas
Expected presentation date	Aug 2019
Requestor Location	Dr. ANELISE BARTH Rua Barão de Santa Tecla apto 303 Pelotas, RS 96010-140 Brazil Attn: Dr. ANELISE BARTH
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

Springer Nature Customer Service Centre GmbH Terms and Conditions

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

1. Grant of License

1. 1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.

1. 2. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

1. 3. If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Scope of Licence

2. 1. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Ts&Cs and any applicable laws.

2. 2. A separate licence may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a licence has been purchased for print only use, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a licence is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence. Any content owned by third parties are expressly excluded from the licence.

2. 3. Similarly, rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.

2. 4. Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes

for, the print version.

2. 5. An alternative scope of licence may apply to signatories of the [STM Permissions Guidelines](#), as amended from time to time.

3. Duration of Licence

3. 1. A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

Scope of Licence	Duration of Licence
Post on a website	12 months
Presentations	12 months
Books and journals	Lifetime of the edition in the language purchased

4. Acknowledgement

4. 1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

5. Restrictions on use

5. 1. Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix 1 below. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.

5. 2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

5. 3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

6. Ownership of Rights

6. 1. Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.

7. Warranty

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND

WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

8. Limitations

8. 1. **BOOKS ONLY:**Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).

9. Termination and Cancellation

9. 1. Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).

9. 2. Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

Appendix 1 — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [**the Licensor**]: [**Journal Publisher** (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [**JOURNAL NAME**] [**REFERENCE CITATION** (Article name, Author(s) Name), [**COPYRIGHT**] (year of publication)

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.2

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Anexo 3.

Track your co-authored submission to Experimental Gerontology

x

Experimental Gerontology <EviseSupport@elsevier.com>

qui, 18 de jul
22:30 (há 4
dias)

para eu

Dear Ms Barth,

Submission no: EXG_2019_432

Submission title: Role of 7-chloro-4-(phenylselanyl) quinoline as a anti-ageing drug fighting the oxidative damage in different tissues of aged rats

Corresponding author: Dr Cristiane Luchese

Listed co-author(s): Dr diogo novo, Ms Anelise Barth, Dr Ethel Wilhelm, Dr Marcia Mesko, Professor Diego Alves, Ms Gabriel da Costa

Dr Luchese has submitted a manuscript to Experimental Gerontology and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

[http://www.evise.com/profile/api/navigate/EXG?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach05315565%23%2FEXG%2Fsubmission%2FEXG_2019_432&email=anebarth.88@gmail.com&firstNa
me=Anelise&surname=Barth&country=Brazil&title=Ms](http://www.evise.com/profile/api/navigate/EXG?resourceUrl=%2Fco-author%2F%3Fdgcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach05315565%23%2FEXG%2Fsubmission%2FEXG_2019_432&email=anebarth.88@gmail.com&firstName=Anelise&surname=Barth&country=Brazil&title=Ms)

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at: <https://service.elsevier.com>

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

Experimental Gerontology

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can unsubscribe via this link:

http://www.evise.com/co-author/#/EXG/unsubscribe/anebarth.88@gmail.com/85PQ8nrnXUvGN9PRVWHuzlNsMcy1kww1HeTqEy8VBQ4_xiCelqtN0xaAOvz8NM9L88Q_4-ad-66bFOL9QdKniQ