

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DO  
COMPOSTO ORGÂNICO DE SELÊNIO EBSELEN NA  
ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE  
CEREBRAL EM RATOS *IN VITRO***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Franciele Martini**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DO  
COMPOSTO ORGÂNICO DE SELÊNIO EBSELEN NA  
ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE  
CEREBRAL EM RATOS *IN VITRO***

**por**

**Franciele Martini**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas,  
Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Rogério Zeni**

**Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristina Wayne Nogueira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2015**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Naturais e Exatas  
Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica**

**A comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DO  
COMPOSTO ORGÂNICO DE SELÊNIO EBSELEN NA  
ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE  
CEREBRAL EM RATOS *IN VITRO***

Elaborada por  
**Franciele Martini**

Como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Bioquímica Toxicológica**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Gilson Rogério Zeni, Dr.**  
(Presidente Orientador)

---

**Roselia Maria Spanevello, Dr<sup>a</sup> (UFPEL)**

---

**Marcelo Farina, Dr. (UFSC)**

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015.

*Aos meus queridos pais,*

*Claudio e Ires,*

*dedico este trabalho*

*e todo o meu amor!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar sempre comigo, me iluminando e guiando meu caminho!

Aos meus pais, Claudio e Ires, por todo amor, dedicação, segurança, apoio e por todos os ensinamentos, mesmo longe sempre estiveram presentes em minha vida sem medir esforços. Amo muito vocês!!

Às minhas irmãs Andréia e Rosiéli por todo carinho, ajuda e por sempre me incentivarem a seguir em frente. Obrigada por vocês existirem em minha vida!

Ao meu querido, Bruno, pela ajuda, carinho e por fazer tudo para me ver feliz.

À minha orientadora, Cristina, por quem tenho muita admiração e respeito, pela oportunidade e todo conhecimento que foi fundamental para o meu crescimento desde a iniciação científica. Pelo carinho, pela competência, dedicação e paciência, meus eternos agradecimentos! Ao GZ, pela orientação, apoio, amizade e muitos momentos de descontração, muito obrigada.

Ao César, por ser meu “pai científico” seus ensinamentos foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui. Aprendi muito com você!

À Suelen Morena por ter sido minha companheira na realização deste trabalho, muito obrigada!

Aos meus eternos veteranos Marcel e Suzan, obrigada pela amizade e parceria e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos meus amigos que a vida me presenteou, Hecson, Melise, Litiérri, e Louise pela amizade, apoio, e carinho de sempre!

Aos “antigos” colegas de laboratório, Marina, Bibiana, Ethel, Simone, Juliana, Tuka.

Aos “atuais” colegas, Eluza, Gláubia, Carla, Crisinha, Suélen, Váva, Marlon, Pietro, Carol, Ana Paula, Zé, Paulo César, Daniela, Natália, Carol, Bruna e Vinícius, obrigada pelo apoio e amizade.

Aos colegas do lab GZ, muito obrigado pela amizade e síntese dos compostos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica.

Ao Rinaldo pelo cuidado com os animais e à tia Tereza pela limpeza do nosso lab.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela oportunidade de realização deste curso.

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo auxílio financeiro para execução desse projeto.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

*"A alegria está na luta, na tentativa,  
no sofrimento envolvido  
e não na vitória propriamente dita."*

*Mahatma Gandhi*

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria

### **AValiação DO EFEITO INIBITÓRIO DO COMPOSTO ORGÂNICO DE SELÊNIO EBSELEN NA ATIVIDADE DA ENZIMA ACETILCOLINESTERASE CEREBRAL DE RATOS *IN VITRO***

AUTOR: FRANCIELE MARTINI

ORIENTADOR: GILSON ROGÉRIO ZENI

CO-ORIENTADORA: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 27 de fevereiro de 2015

A acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima regulatória que modula as sinapses colinérgicas através da hidrólise da acetilcolina (ACh), um neurotransmissor envolvido em diversos processos biológicos, em especial na memória e na cognição. Dessa forma, os inibidores da AChE foram inicialmente desenvolvidos para o tratamento de disfunções cognitivas, principalmente relacionadas com a doença de Alzheimer. Os inibidores da AChE disponíveis no mercado, como, a tacrina, rivastigmina, donepezila, galantamina, apesar de eficientes apresentam limitações, como a baixa biodisponibilidade, e efeitos colaterais a nível gastrointestinal e hepático. O ebselen, um composto orgânico sintético de selênio, é considerado um potente agente farmacológico em função de seus diversos efeitos já reportados, entre eles antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor, e também pela baixa toxicidade atribuída à molécula. Sabe-se que o ebselen atravessa a barreira hematoencefálica e é seguro com base na toxicidade celular e ensaios clínicos de Fase I-III. Há evidências de que o ebselen inibe a atividade da AChE cerebral em ratos *ex vivo*, o que gerou grande interesse por estudos mais aprofundados a respeito do seu possível uso como tratamento para disfunções cognitivas. Com o propósito de ampliar o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nesta ação, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do ebselen na atividade da AChE cerebral *in vitro*, determinando sua concentração que inibe a atividade da enzima em 50% (CI<sub>50</sub>), o perfil cinético via Michaelis-Menten e Lineaweaver-Burk, bem como a reversibilidade da inibição por diálise. Os resultados obtidos demonstraram que o ebselen inibiu a atividade da AChE com a CI<sub>50</sub> de 29 µM, semelhante ao valor encontrado para a AChE purificada de enguia elétrica. O ebselen apresentou uma inibição de caráter misto, e reversível, devido ao aumento do K<sub>m</sub> e diminuição da V<sub>max</sub>. Além disso, observou-se

uma inibição reversível, dado que a atividade da AChE foi recuperada após 60 minutos de diálise. Considerando os resultados obtidos neste estudo, o uso do ebselen como um agente terapêutico para o tratamento de doenças associadas às disfunções colinérgicas deve ser considerado, embora estudos comportamentais de memória sejam necessários para fundamentar esta hipótese.

**Palavras-chave:** Ebselen, selênio, acetilcolinesterase, cérebro, rato, inibição, perfil cinético, reversibilidade.



## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **EVALUATION OF THE INHIBITORY EFFECT OF ORGANOSELENIUM COMPOUND EBSELEN ON ACTIVITY OF CEREBRAL ACETYLCHOLINESTERASE OF RATS *IN VITRO***

AUTHOR: FRANCIELE MARTINI  
ADVISOR: GILSON ROGÉRIO ZENI  
CO-ADVISOR: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA  
Place and Date of the defense: Santa Maria, February 27, 2015

Acetylcholinesterase (AChE) is an important regulatory enzyme that modulates cholinergic synapses by hydrolysis of acetylcholine (ACh), a neurotransmitter involved in many biological processes, especially in memory and cognition. Thus, AChE inhibitors were initially developed for the treatment of cognitive disorders, especially related to Alzheimer's disease. Currently, the inhibitors on the market, such as tacrine, rivastigmine, donepezil, galantamine, although efficient have limitations, such as low bioavailability, gastrointestinal and hepatic side effects. Ebselen, a synthetic organic compound of selenium, is considered a potent pharmacological agent due to its various effects already reported, including antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects, and also low toxicity attributed to the molecule. This compound crosses the blood brain barrier and is safe based on cellular toxicity and clinical trials Phase I-III. There is evidence that ebselen inhibits AChE activity *ex vivo* in brain rats, which generated great interest in further studies about its possible use as a treatment for cognitive dysfunction. In order to increase the knowledge about the mechanisms involved in this action, this study aimed to evaluate the effect of ebselen on the brain AChE activity *in vitro* by determining its IC<sub>50</sub>, the kinetic profile via Michaelis-Menten and Lineaweaver-Burk and as reversibility of inhibition by dialysis. The results show that ebselen inhibited AChE activity with an IC<sub>50</sub> of 29 μM, similar to the value found for the purified electric eel AChE. Ebselen showed a mixed inhibition due to its increased K<sub>m</sub> and decreased V<sub>max</sub>. Besides, it was observed a reversible inhibition, because the AChE activity was recovered after 60 min of dialysis. Considering, the results obtained in this study, the use of ebselen as a therapeutic agent for treatment of diseases associated with cholinergic dysfunction should be considered, although behavioral studies of memory are required to support this hypothesis.

**Keywords:** Ebselen, selenium, acetylcholinesterase, brain, rat, inhibition, mixed, kinetic profile, reversibility.

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

## INTRODUÇÃO

**Figura 1. A)** Síntese de acetilcolina **B)** O mecanismo de hidrólise do neurotransmissor ACh..... 17

**Figura 2.** Estrutura química do ebselen  $C_{13}H_9NOSe$  ..... 24

## ARTIGO CIENTÍFICO

**Figure 1.** Chemical structure of ebselen..... 30

**Figure 2.** Different concentrations of ebselen on AChE activity on rat homogenates..... 31

**Figure 3.** Effect of ebselen on the enzyme kinetics of AChE shown as a Michaelis-Menten plot (B). Ebs – ebselen; AcSCh – acetylthiocholine..... 32

**Figure 4.** Effect of ebselen ( $IC_{50}$ ) on  $K_m$  (A) and  $V_{max}$  (B) of AChE activity obtained by non-linear regression..... 32

**Figure 5.** Reversibility by dialysis of AChE activity inhibited by ebselen at  $IC_{50}$  (A)..... 32

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Características farmacológicas dos inibidores da colinesterase .....	20
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACh** = Acetilcolina

**AChE** = Acetilcolinesterase

**AChEI** = Inibidor de acetilcolinesterase

**ANVISA** = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**BChE** = Butirilcolinesterase

**ChAT** = Enzima colina acetiltransferase

**ChEs** = Colinesterases

**CI50** = Concentração que inibe a atividade da enzima em 50%

**CoA** = Coenzima A

**DA** = Doença de Alzheimer

**DTNB** = 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

**FDA** = Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos

**GPx** = Glutathione peroxidase

**IDR** = Ingestão diária recomendada

**IMPase** = Inositol monofosfatase

**NADPH** = Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzida

**OMS** = Organização Mundial da Saúde

**Se** = Selênio

**SNC** = Sistema Nervoso Central

**SNP** = Sistema nervoso periférico

**TNB** = 2-nitro-5-tiobenzoato

**A $\beta$**  = Fragmento  $\beta$ -amilóide

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Acetilcolinesterase .....	16
1.1.1 Inibidores da Acetilcolinesterase.....	17
1.1.2 Aplicação Clínica dos AChEI .....	20
1.2 Selênio.....	21
1.2.1 Compostos orgânicos de selênio .....	23
2. OBJETIVOS .....	27
2.1. Objetivo geral.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. RESULTADOS .....	28
3.1 Artigo .....	29
4. CONCLUSÃO .....	35
5. PERSPECTIVAS .....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
7. APÊNDICE .....	45

## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação de mestrado está estruturada em seções dispostas na seguinte forma: Introdução, Objetivos, Artigo Científico, Conclusões, Perspectivas e Referências.

Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências encontram-se inseridos no próprio artigo contido na seção **ARTIGO CIENTÍFICO** e representa a íntegra deste estudo.

As **REFERÊNCIAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** desta dissertação.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Acetilcolinesterase

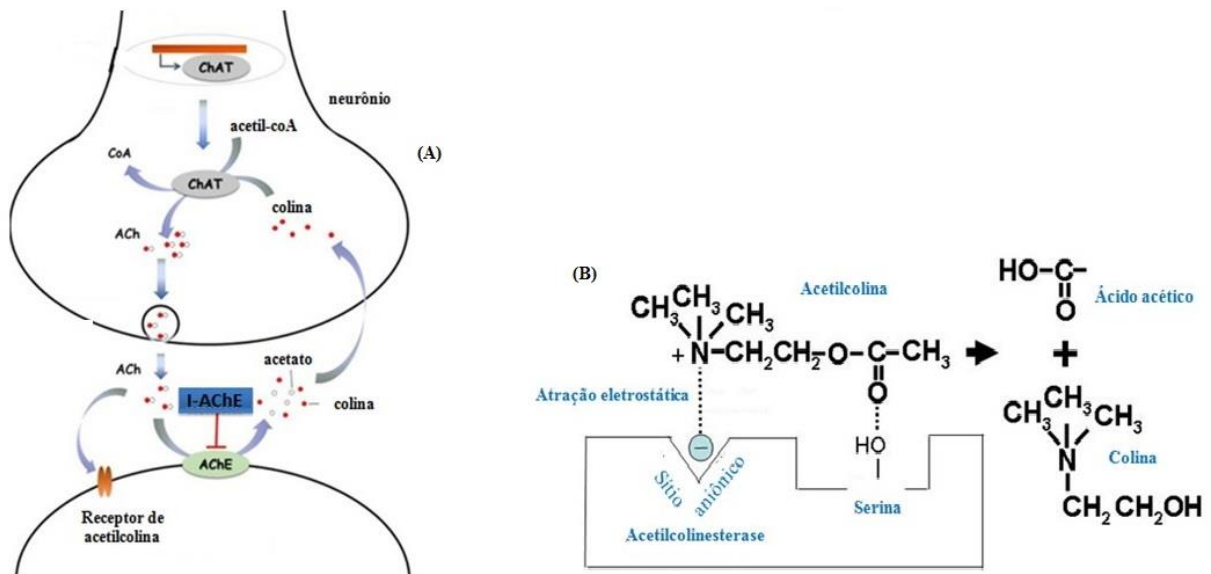
O neurotransmissor acetilcolina (ACh) é sintetizado a partir de colina e da coenzima A (Figura 1A) (CoA) pela ação catalítica da enzima colina acetiltransferase (ChAT) principalmente nos neurônios colinérgicos localizados nos núcleos da base de Meyer que se projetam para o córtex e hipocampo. Após sua formação, a ACh é liberada na fenda sináptica, onde poderá se ligar a dois tipos de receptores, os muscarínicos e nicotínicos dando início à transmissão colinérgica ou será degradada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), principal moduladora do tônus colinérgico no sistema nervoso central (SNC) (SCHLIEBS; ARENDT, 2011).

A ACh é amplamente distribuída no sistema nervoso onde participa de várias funções vitais. A ativação dos receptores colinérgicos no sistema nervoso periférico (SNP) tem ações que incluem a redução da frequência e a força da contração cardíaca, o relaxamento de vasos sanguíneos periféricos e a constrição das vias respiratórias. E no SNC, estão envolvidos nas sinapses associadas ao controle motor, memória, cognição, aprendizado e atenção, em respostas emocionais, na modulação do estresse, no sono e na vigília (SCHLIEBS; ARENDT, 2006).

O mecanismo de ação da hidrólise da enzima AChE envolve o ataque nucleofílico do aminoácido serina à carbonila da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada. Ao final, a hidrólise do grupo acetila da serina pela água recupera o sítio catalítico da enzima (SOREQ; SEIDMAN, 2001) (Figura 1B).

Com base em evidências experimentais e clínicas, a ACh é considerada um dos mais importantes neurotransmissores envolvidos na regulação das funções cognitivas (BERGER-SWEENEY, 2003; SCHLIEBS; ARENDT, 2006; AGRAWAL et al., 2009; ISHRAT et al., 2009). Prova disso é o fato de que com o processo de envelhecimento os neurônios colinérgicos sofrem moderada degeneração, acarretando em uma hipofunção colinérgica, a qual tem sido relacionada com declínios cognitivos progressivos (SCHLIEBS; ARENDT, 2011).





**Figura 1.** A) Síntese de acetilcolina. B) O mecanismo de hidrólise do neurotransmissor ACh. Adaptado Quím. Nova vol. 27 n° 4 São Paulo Julho/Agosto, 2004.

Dessa forma, moléculas que podem modular o tônus colinérgico apresentam-se como potenciais candidatas para o tratamento de doenças associadas ao déficit cognitivo. Além do mais, a pesquisa a respeito da elevação dos níveis de acetilcolina seria útil para melhorar os sinais de deficiência de aprendizado e apresenta-se como algo a ser incentivado, principalmente, devido às limitações conhecidas dos fármacos disponíveis.

### 1.1.1 Inibidores da Acetilcolinesterase

Os Inibidores da acetilcolinesterase (AChEI) têm proporcionado resultados terapêuticos significativos no contexto de muitas doenças que apresentam como sintoma déficit cognitivo, tais como, a doença de Parkinson, a doença com corpos de Lewy, a demência vascular, a injúria traumática cerebral e a desordem cognitiva em esclerose múltipla (SUSSMAN et al. 1993). O principal mecanismo de ação dos AChEI é atribuído a redução da atividade catalítica das colinesterases (ChEs) levando assim, a redução do déficit cognitivo e da memória, principalmente, na doença de Alzheimer, também na apatia e nas alucinações visuais (RIZZO; 2011). Mais que isso, essa classe de compostos têm sido efetiva para reverter efeitos causados por entorpecentes, podendo ser aplicados como co-fármaco no tratamento de dependentes químicos. Além disso, os AChEI têm sido utilizados no tratamento de glaucoma, e miastênia gravis (DOUCET, et al 1992; KRONMAN, et al 1994).

O órgão governamental responsável pela regularização do uso de medicamentos dos Estados Unidos (FDA) aprovou para o tratamento de doenças neurodegenerativas, até o ano de 2000 (KRONMAN, et al 1994) quatro AChEI: a tacrina, a rivastigmina, a donepezila e a galantamina. Essas moléculas alteram o tônus colinérgico central ao inibir as enzimas que degradam a ACh (enzimas AChE e butirilcolinesterase (BChE)), aumentando, assim, a possibilidade deste neurotransmissor de estimular os receptores nicotínicos e muscarínicos cerebrais. No entanto, estes fármacos, apesar de moderadamente eficazes no alívio dos sintomas, como por exemplo o prejuízo cognitivo presente na fisiopatologia da doença de Alzheimer (DA), têm baixa biodisponibilidade e uma série de efeitos colaterais, incluindo distúrbios gastrointestinais e hepáticos (PORCEL; MONTALBAN, 2006).

A importância da AChE nos déficits cognitivos, especialmente na doença DA, vai além do controle dos níveis de hidrólise da ACh. Evidências sugerem que a AChE poderia desempenhar um papel chave no desenvolvimento das placas senis, acelerando a agregação e a deposição do peptídeo  $\beta$ -amilóide ( $A\beta$ ), uma das características neuropatológicas mais relevantes na DA e esse efeito poderia ser atenuado por inibidores da AChE, como a donepezila e a fisostigmina (BENTLEY et al., 2011).

Os AChEI podem ser classificados de acordo com a duração de sua ação sobre as colinesterases e a possibilidade de reversão de sua inibição conforme está demonstrado na tabela 1. Os fármacos AChEI comerciais incluem a tacrina,  $CI_{50} = 0.0271 \mu M$ , a rivastigmina,  $CI_{50} = 5.5 \mu M$ , a galantamina,  $CI_{50} 0.35 \mu M$ , e a donepezila,  $CI_{50} = 0.0116 \mu M$ . Os dois últimos são inibidores reversíveis das AChE respectivamente de duração intermediária e longa, já a rivastigmina tem ação de duração intermediária e é lentamente reversível (MESULAM; GEULA, 1994).

A tacrina foi o primeiro inibidor reversível da AChE a ser utilizado no tratamento de doenças neurodegenerativas (inibidor de primeira geração) (SOTRIFFER, et al 2003). Além disso, a molécula também inibe a BChE, o que auxilia no controle da formação das placas senis entre os neurônios, característica histopatológica encontrada em portadores de doenças neurodegenerativas. Entretanto, este inibidor acarreta uma quantidade maior de efeitos colaterais (HAREL, et al 1992). Além disso, esse medicamento apresenta efeito hepatotóxico, levando ao aumento das transaminases hepáticas, instalando um quadro de hepatite medicamentosa, o que por consequência causa a retirada da medicação em muitos pacientes. De fato, mais de 90% dos casos envolvendo a hepatite medicamentosa na DA ocorreram nas primeiras 12 semanas de tratamento com a tacrina (ALMEIDA, 1998).

A rivastigmina também é capaz de inibir tanto a enzima AChE quanto a BChE, apresentando, assim, maior eficácia quanto ao aumento dos níveis cerebrais de ACh. Entretanto, em altas doses, esse medicamento causou vários efeitos colaterais, além de danos gastrointestinais associados com aumento de peso (GROSSBERG, 2003). Estudos cinéticos realizados com a rivastigmina classificaram seu perfil inibitório como pseudo-irreversível, pois a interação da enzima com a droga leva a formação de dois produtos: um de rápida excreção e um complexo carboamilado com a enzima, o qual impede a hidrólise da acetilcolina de forma competitiva e longa duração, porém reversível. Desse modo o efeito dessa droga perdura mesmo após sua eliminação do organismo, reduzindo os riscos de interação com outros medicamentos (GROSSBERG, 2003).

O primeiro dessa nova geração de inibidores que obteve ampla aprovação no mercado foi a donepezila, caracterizada como um inibidor reversível seletivo da AChE. Esse medicamento foi extensamente testado e o primeiro em que a maioria dos ensaios utilizou a metodologia padronizada proposta pelo FDA (FLICKER, 2002). O mesmo trabalho também demonstrou que o tratamento crônico por 1 ano com esse medicamento foi associado a uma redução de 38% no declínio funcional dos pacientes portadores da DA (FERGUSON, 2000). A galantamina também é um anticolinesterásico reversível e competitivo apresenta um duplo mecanismo de ação, além da inibição da AChE, também modula alostericamente os receptores nicotínicos (LEVIN, 2000).

Os avanços obtidos na compreensão da evolução e das razões moleculares da gênese das doenças neurodegenerativas têm demonstrado que o uso de AChEI deve ser a forma mais eficiente de controle da evolução dessas doenças. Assim sendo, a principal estratégia no tratamento de doenças neurodegenerativas, infelizmente, a sua utilização clínica é limitada devido a fatores como baixa biodisponibilidade e seus efeitos adversos, especialmente a hepatotoxicidade.

**Tabela 1.**

Características farmacológicas dos inibidores da colinesterase.

<b>Medicamento</b>	<b>Tacrina</b>	<b>Donepezila</b>	<b>Rivastigmina</b>	<b>Galantamina</b>
<b>Classe</b>	Acridina	Piperidina	Carbamato	Alcalóide Fenantreno
<b>Meia-vida(h)</b>	2 a 4	~70	~1,5	~ 6
<b>Biodisponibilidade (%)</b>	17 a 37	100	40	100
<b>Via de eliminação</b>	Fígado	Fígado	Rim	50% fígado 50% rim
<b>Seletividade</b>	AChE e BuChe	AChE	AChE e BuChe	AChE
<b>Metabolismo CYP 450</b>	Sim	Sim	Mínimo	Sim
<b>Cl<sub>50</sub></b>	0,0271µM	0,0116 µM	5,5 µM	0,35 µM

Fonte: Adaptado de Orestes, 2014.

### 1.1.2 Aplicação Clínica dos AChEI

A demência é uma síndrome neurológica, geralmente crônica, caracterizada principalmente por uma progressiva e global perda da memória e da capacidade intelectual do indivíduo, de forma a interferir nas suas atividades sociais ou ocupacionais. Além do prejuízo cognitivo, um comprometimento da linguagem, raciocínio matemático e da capacidade de compreensão e julgamento também são sintomas comuns de pacientes dementes (JANCA et al., 2006; STIX, 2010).

Sabe-se que existem cerca de 39 milhões de pessoas mundialmente diagnosticadas com algum tipo de demência, e a DA é a principal enfermidade associada a este transtorno. Atualmente, estima-se que 60% dos pacientes acima de 65 anos que sofrem de alguma forma de demência no mundo são doentes de Alzheimer e 26% dos pacientes possuem demência vascular, sendo bastante comum a associação de ambas (JANCA et al., 2006; KALARIA et al., 2008).

O envelhecimento é o principal fator de risco para a demência. Estima-se que apenas 6% dos casos de demência acometam pessoas com idade inferior a 65 anos. Além disso, mulheres são ligeiramente mais suscetíveis ao desenvolvimento deste quadro. Outros fatores como o estilo de vida, dieta, transtornos que afetam o sistema vascular, como hipertensão, diabetes tipo 2 e obesidade, aumentam o risco de demência (KALARIA et al., 2008).

Mesmo que a idade seja o principal fator de risco para o desenvolvimento de uma demência, seu impacto no prognóstico de vida dos pacientes é inconclusivo, assim como o do fator gênero. Variáveis como o tipo de demência e a severidade da doença influenciam diretamente a expectativa média de vida dos pacientes com tal síndrome. Em geral, algumas formas de demência evoluem para a morte em torno de três a dez anos após o diagnóstico (BRODATY et al., 2012). Somado a isso, infelizmente, ainda não há cura conhecida ou medidas preventivas para a maioria dos tipos de demência.

Foram documentadas alterações no sistema colinérgico em pacientes com neurodegenerações. Na DA, evidências demonstram uma correlação positiva entre a intensidade dos sintomas clínicos com a redução dos marcadores corticais de atividade colinérgica, como a atividade da ChAT, da densidade dos receptores muscarínicos e os níveis de ACh (NORDBERG, 1992; BIERER et al., 1995; BARTUS, 2000; GSELL et al., 2004). Estes dados conduziram à formulação da hipótese colinérgica na disfunção da memória.

O fundamento da hipótese colinérgica está relacionado à capacidade de fármacos moduladores positivos do tônus colinérgico central induzirem melhora no perfil cognitivo e, também, na redução dos efeitos comportamentais provenientes da doença (CUMMINGS et al., 1998). Várias alternativas terapêuticas foram avaliadas no intuito de corrigir o déficit colinérgico em portadores de demências. Algumas estratégias inicialmente empregadas envolveram a utilização ou substituição de precursores de ACh, colina ou lecitina, as quais entretanto não se mostraram eficientes no incremento da atividade colinérgica central. Outros estudos investigaram o uso de AChEI, aumentando o tempo de permanência da ACh na fenda sináptica (SCHLIEBS e ARENDT, 2006). Dentre os AChEI aprovados para o tratamento sintomático da DA estão a tacrina, a rivastigmina, a dopenezila e a galantamina, no entanto a tacrina não é mais utilizada, pela dificuldade de administração e por seus efeitos adversos.

## **1.2 Selênio**

O selênio (Se), elemento químico descoberto por Jöns Jakob Berzelius em 1817, não metálico e pertencente à família dos calcogênios da tabela periódica, é um componente de selenoproteínas, algumas das quais têm importante função enzimática. O Se auxilia no equilíbrio da quantidade de espécies reativas aos níveis basais, prevenindo possíveis eventos

oxidativos que venham a causar prejuízos às biomoléculas. Além disso, sabe-se que o Se está relacionado ao funcionamento adequado do sistema imunológico e na regulação dos hormônios tireoideanos (RAYMAN, 2000).

Quantidades adequadas de Se são necessárias para a manutenção da saúde, por este motivo, tanto a Organização Mundial da Saúde (OMS) quanto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aconselham uma ingestão diária recomendada (IDR) de 34-35 µg em adultos, (FAO/WHO, 2002), seja através da ingestão de alimentos comuns como, alho, castanha-do-pará, cebola, brócolis, cogumelos, cereais, pescados, ovos e carnes ou também por suplementação (DUMONT et al., 2006; RAYMAN, 2008). Além disso, a biodisponibilidade do Se varia de acordo com a fonte e estado nutricional do indivíduo, sendo significativamente maior para as formas orgânicas de selênio, que, apresenta, no geral, menor toxicidade que as formas inorgânicas deste elemento (KIM; MAHAN, 2001; YOUNG et al., 1982). Concentrações insuficientes na dieta, ou seja, IDR menor que 10 µg/dia, como em regiões de solo pobre em Se, estão relacionadas ao aparecimento da doença de Keshan, a qual apresenta sintomas como fadiga e perda de apetite, insuficiência cardíaca, cardiomegalia e falência cardíaca congestiva (GE et al., 1983).

Sabe-se que este elemento desempenha importante papel para o cérebro. Estudos demonstram que quando há depleção de Se no organismo, o cérebro recebe uma oferta prioritária deste elemento em relação aos outros órgãos (BUCKMAN et al., 1993; WHANGER, 2001). O baixo nível de Se no cérebro tem efeitos negativos sobre seu funcionamento e está associado a déficit cognitivo, podendo facilitar o desencadeamento de doenças neurodegenerativas, como a DA (SCHWEIZER et al., 2004; CORRIGAN et al., 1991), além de alterar a taxa de *turnover* de neurotransmissores (CASTANO et al., 1997). Além disso, níveis diminuídos deste elemento na dieta (< 40 µg/dia) estão associados com um aumento na incidência de ansiedade, depressão e agressividade (FINLEY; PENLAND, 1998), enquanto que o aumento dos níveis de Se na dieta estão associados à melhora do humor e estado depressivo (BENTON; COOK, 1991; RAYMAN et al., 2006; RAYMAN, 2008), porém altos níveis deste elemento possam ser tóxicos (MOXON; RHIAN, 1943). Diante disso, a pesquisa científica tem dado atenção aos efeitos farmacológicos de compostos orgânicos de selênio, principalmente no que se refere aos seus efeitos sobre o SNC (NARAJI et al., 2007; PATAI, 2012).

### 1.2.1 Compostos orgânicos de selênio

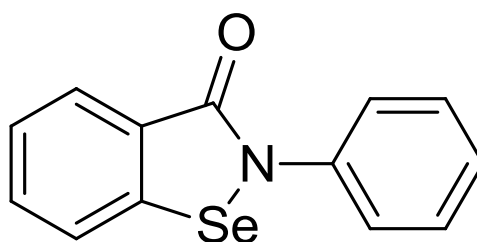
Os compostos orgânicos de selênio tem sido extensivamente estudados, e despertaram interesse científico nas últimas décadas devido as suas propriedades e farmacológicas, visto que muitos estudos demonstram o potencial terapêutico destes compostos (NOGUEIRA et al., 2004). Esta classe de compostos é reportada como potentes antioxidantes em modelos de estresse oxidativo *in vitro* e *in vivo* (BORTOLATTO et al., 2013; MEOTTI et al., 2004; MULLER et al., 1984), bem como, os compostos orgânicos de selênio apresentam atividade neuroprotetora (PORCIUNCULA et al., 2001; ROSSATO et al., 2002), anti-hipertensiva, anticâncer, antiviral, imunossupressora, antimicrobiana, ansiolítica, antidepressiva e anti-inflamatória (BRUNING et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2003; SAVEGNAGO et al., 2008; ZASSO et al., 2005). Além da vasta literatura evidenciando os efeitos destas moléculas nos mais diversos modelos animais (NOGUEIRA; ROCHA, 2010; NOGUEIRA; ROCHA, 2011), existem também estudos clínicos em humanos com estes compostos (YAMAGUCHI et al., 1998; OGAWA et al., 1999).

Ainda, estudos demonstram o efeito neuroprotetor dos organoselênios, a selênio-metionina, protege os neurônios da morte celular induzida pelo ferro e pelo peptídeo  $\beta$ A (XIONG et al., 2007). Assim, conseqüentemente, o interesse pela química e bioquímica de compostos orgânicos contendo Se cresceu consideravelmente, uma vez que essas moléculas demonstraram ter promissoras propriedades farmacológicas.

O ebselen (2-fenil-1,2-benzilselenazol 3(2H)-on) também chamado de PZ51 (Figura 2), é um composto orgânico de Se, que tem se destacado na literatura pelas suas propriedades farmacológicas. O conceito acerca do transporte do ebselen no organismo é de que o mesmo esteja ligado a proteínas, e que haja uma troca com tióis de baixo peso molecular dentro das células e tecidos (SIES, 1993). Wendel e colaboradores (1984) sugeriram que o Se presente na molécula do ebselen não estaria biodisponível, portanto, este Se não entraria juntamente com o Se corporal disponível e metabolizável, o que poderia explicar a baixa toxicidade do ebselen em modelos experimentais. Para confirmar esta característica, Wendel e colaboradores (1986) suplementaram animais deficientes em selênio e com atividade da glutathiona peroxidase (GPx) baixa com ebselen, e observaram que a atividade da enzima não foi restaurada.

O ebselen é um composto não tóxico de baixo peso molecular que apresenta uma potente atividade de mimetizar a enzima GPx (YAMAGUCHI et al., 1998; HERIN et al.,

2001; LI; CAO, 2002; IMAI et al.,2003) portanto, um excelente antioxidante. Além disso, foi um dos primeiros compostos sugerido para a terapia de inativação de hidroperóxidos na presença de glutathione (PARNHAM; KINDT, 1984). A propriedade do ebselen em reduzir hidroperóxidos foi vista através de um ensaio enzimático utilizando NADPH e glutathione redutase. Essa redução de hidroperóxidos orgânicos faz com que o ebselen atue protegendo lipoproteínas e membranas (SCHEWE, 1995; HERIN et al., 2001). Outra propriedade importante deste composto é a ação antiinflamatória, efeitos inibitórios do ebselen, como os vistos em sistemas geradores de radicais livres, incluem inibição da infiltração inflamatória de leucócitos, da liberação de citocinas, da síntese de leucotrienos, e do dano gástrico e hepático (PARNHAM e SIES, 2000; FÜRSTENAU, et al., 2004), além disso, o ebselen também demonstrou ter ação antiaterosclerótica e citoprotetora em modelos biológicos (SCHEWE, 1995).



**Figura 2.** Estrutura química do ebselen  $C_{13}H_9NOSe$ .

O ebselen foi a primeira molécula orgânica de Se a ter propriedade neuroprotetora reportada contra a isquemia (DAWSON et al., 1995; NAMURA et al., 2001), efeito possivelmente atribuído à sua ação antioxidante (MOUSSAOUI et al., 2000; ROSSATO et al., 2002). Além disso, estudos mostram efeitos protetores na neurotoxicidade induzida por MeHg *in vivo* (FARINA et al., 2003), age também reduzindo a citotoxicidade induzida pelo glutamato em cultura primária de neurônios, o qual deve ser mediado pela inibição dos receptores glutamatérgicos (PORCIUNCULA et al., 2001). Dentre os mecanismos potencialmente envolvidos na neuroproteção pelo ebselen, citam-se a inibição da peroxidação lipídica (PORCIÚNCULA et al., 2001), inibição de enzimas envolvidas em processos inflamatórios (lipoxigenases, NADPH oxidase, proteína quinase C, lipoxigenases, NAPH oxidase) e neutralização do radical peroxinitrito (SCHEWE, 1995). Mais recentemente o ebselen foi efetivo em inibir a fosforilação da Tau induzida pelo ferro em cultura de células, devido a inibição do influxo do metal (XIE et al., 2012).



Foi relatado que o ebselen inibe a inositol monofosfatase (IMPase) e atua como um mimético do lítio em modelos de transtorno bipolar em ratos (LYNCH; KIL, 2009). Verificou-se também que a inibição da IMPase pelo ebselen é covalente e irreversível (SINGH et al., 2011; UETRECHT, 2003). Portanto, o ebselen representa uma alternativa mais segura que o lítio para o tratamento de transtorno bipolar. Demonstrou ser altamente eficaz na redução da citotoxicidade induzida por metais, tais como toxicidade causada por cádmio, ferro, MeHg, e a cisplatina (OCAKCI et al., 2006; HARDEJ; TROMBETTA, 2002). Assim, o tratamento com ebselen suprime o estresse oxidativo e protege as células contra a citotoxicidade induzida por MeHg (GUÉRIN; GAUTHIER, 2003). Outra propriedade do ebselen demonstrada em estudo realizado por NAMURA e colaboradores (2001) é agir como inibidor de apoptose. Ainda, o ebselen tem mostrado propriedades protetoras em modelos experimentais de diabetes induzida geneticamente e diabetes induzida com aloxano, assim como contra complicações decorrentes da diabetes como a retinopatia e a disfunção endotelial (CHANDER et al. 2004).

O ebselen faz parte de uma biblioteca química de drogas biodisponíveis e consideradas clinicamente seguras (U.S. National Institutes of Health Clinical Collection). Com base nas suas propriedades, mencionadas anteriormente, este composto foi utilizado em ensaios clínicos de fase III para prevenção de acidente vascular cerebral isquêmico (SCHEWE, 1995; OGAWA et al, 1999), os resultados destes estudos clínicos revelaram que o ebselen proporcionou uma melhora significativa em pacientes que são acometidos por isquemia cerebral de curta duração, mas não em pacientes que sofreram derrame não-oclusivo severo. Os efeitos benéficos do ebselen foram intimamente correlacionados com a rapidez do início do tratamento após o choque isquêmico, e a segurança e tolerabilidade ao ebselen foram eficazes e não houve efeitos adversos aparentes.

Em ensaios clínicos de fase II, o ebselen está sendo avaliado na sua segurança e eficácia em uma formulação oral para a prevenção de alterações no limiar auditivo (U.S. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH).

Além disso, há evidências na literatura de que este composto tem ação inibitória na atividade da AChE em ratos, quando administrado aguda e cronicamente (MAZZANTI et al, 2006; COSTA et al, 2012), um efeito que ainda é pouco explorado.

Considerando o conjunto de propriedades relacionadas a este composto, juntamente com o relatado efeito inibitório do ebselen na atividade da AChE *ex vivo* e a importância do sistema colinérgico nos processos cognitivos, este composto poderia surgir como uma nova

alternativa no tratamento de doenças relacionadas ao prejuízo da memória mediante estudos mais aprofundados do seu efeito inibitório sobre a atividade da AChE.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do ebselen na atividade da AChE cerebral *in vitro*.

### 2.2. Objetivos específicos

Considerando os aspectos mencionados, os objetivos específicos desta dissertação são:

- Verificar se o ebselen exerce efeito inibitório sobre a atividade da AChE em homogenato de cérebro de ratos *in vitro* e em AChE purificada;
- Avaliar a cinética de inibição da AChE pelo ebselen;
- Avaliar reversibilidade da inibição da AChE pelo ebselen.

### **3. RESULTADOS**

Os resultados que fazem parte dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas do artigo estão dispostos de acordo com a recomendação do periódico científico no qual foi publicado.

### 3.1 Artigo

**Efeito inibitório do ebselen na atividade da acetilcolinesterase cerebral *in vitro*:  
cinética e reversibilidade da inibição**

**INHIBITORY EFFECT OF EBSELEN ON CEREBRAL  
ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN VITRO: KINETICS AND  
REVERSIBILITY OF INHIBITION**

Franciele Martini, César Augusto Brüning, Suelen Mendonça Soares, Cristina Wayne  
Nogueira, Gilson Zeni\*



Current Pharmacology Design

## Inhibitory Effect of Ebselen on Cerebral Acetylcholinesterase Activity *In Vitro*: Kinetics and Reversibility of Inhibition

Franciele Martini, César Augusto Brünig, Suelen Mendonça Soares, Cristina Wayne Nogueira, Gilson Zeni\*

\*Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênios, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil

**Abstract:** Ebselen is a synthetic organoselenium compound that has been considered a potential pharmacological agent with low toxicity, showing antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. It is bioavailable, blood-brain barrier permeant and safe based on cellular toxicity and Phase I-III clinical trials. There is evidence that ebselen inhibits acetylcholinesterase (AChE) activity, an enzyme that plays a key role in the cholinergic system by hydrolyzing acetylcholine (ACh), *in vitro* and *ex vivo*. This system has a well-known relationship with cognitive process, and AChE inhibitors, such as donepezil and galantamine, have been used to treat cognitive deficits, mainly in the Alzheimer's Disease (AD). However, these drugs have poor bioavailability and a number of side effects, including gastrointestinal upsets and hepatotoxicity. In this way, this study aimed to evaluate the effect of ebselen on cerebral AChE activity *in vitro* and to determine the kinetic profile and the reversibility of inhibition by dialysis. Ebselen inhibited the cerebral AChE activity with an  $IC_{50}$  of 29  $\mu$ M, similar to  $IC_{50}$  found with pure AChE from electric eel, demonstrating a mixed and reversible inhibition of AChE, since it increased  $K_m$  and decreased  $V_{max}$ . The AChE activity was recovered within 60 min of dialysis. Therefore, the use of ebselen as a therapeutic agent for treatment of AD should be considered, although memory behavior tasks are needed to support such hypothesis.

**Keywords:** Ebselen, selenium, acetylcholinesterase, brain, rat, kinetics profile, mixed, reversibility.

### INTRODUCTION

Ebselen (2-phenyl-1,2-benziselenazol-3(2H)-one) (Fig. 1) is a synthetic organoselenium compound that has been considered a potential pharmacological agent with low toxicity, extensively studied mainly with relation to its antioxidant, neuroprotective and anti-inflammatory effects [1, 2]. In fact, this compound has a marked inhibitory effect on neuronal damage during stroke [3], and prevents ischemia-induced cytotoxicity and apoptosis [4] and reactive oxygen species (ROS) production [5] in astrocytes.

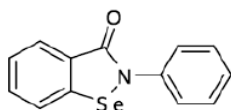


Fig. (1). Chemical structure of ebselen

Ebselen is part of the U.S. National Institutes of Health Clinical Collection, a chemical library of bioavailable drugs considered clinically safe. Based on its proven antioxidant and anti-inflammatory properties, ebselen has been used in phase III clinical trials against acute ischemic stroke [6-8] and in phase II trials to evaluate the safety and efficacy of an oral formulation for the prevention of temporary auditory threshold shift [9].

Besides these already known properties of ebselen, there is evidence in literature that this compound has an inhibitory action in the acetylcholinesterase (AChE) activity *in vitro* [10, 11] and when administered acutely and chronically [12, 13] in rats, an effect that has not been explored so far. Acetylcholinesterase (AChE) is one of the most efficient biological catalysts playing a key role in cholinergic neurotransmission by hydrolyzing the neurotransmitter acetylcholine (ACh) [14, 15].

There is a well-known relationship between the cholinergic system and learning, memory, attention and other common cognitive processes [16]. Indeed, the impaired function of cholinergic system has been related to cognitive deficits, as observed in Alzheimer's Disease (AD) [17]. Therefore, a potential treatment strategy was aimed at enhancing cholinergic function by using AChE inhibitors [18]. These compounds have demonstrated some beneficial effects and with few exceptions, they are the only class of drugs currently approved by the Food and Drug Administration (FDA) for AD treatment. Unfortunately, their clinical use is limited due to their low bioavailability and their undesirable side effects, especially hepatotoxicity.

Considering the reported inhibitory effect of ebselen on AChE activity and the importance of cholinergic system to cognitive processes, this study aimed to investigate the inhibitory effect of ebselen on the cerebral AChE activity *in vitro* and to determine the kinetic profile as well as the reversibility of inhibition.

### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals** - Ebselen was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described by Engman and Hallberg [19]. Analysis of the  $^1H$  NMR and  $^{13}C$  NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of ebselen (99.9%) was determined by GC/MS. Ebselen was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) for all experiments. 5,5-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), acetylthiocholine iodide and acetylcholinesterase from *Electrophorus electricus* (electric eel) were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). All other chemical reagents utilized were obtained from standard commercial suppliers.

**Animals** - Male adult Wistar rats (150-200 g) from our own breeding colony were used. The animals were kept in a separate animal room on a 12 h light/dark cycle at a room temperature of  $22 \pm 2$   $^{\circ}C$ , with free access to food and water. Animals were used according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy of Sciences, The National Academies Press, Washington, D.C) and in accordance to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animals Resources, the Federal University of Santa Maria, Brazil. All efforts were made to

\*Address correspondence to this author at the Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil; Tel: 55-55-3220-9; Fax: 55-55-3220-8978; E-mail: [gzeni@ufsm.br](mailto:gzeni@ufsm.br)

minimize animals suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

**Tissue preparation** - Animals were killed by decapitation, and brains were quickly removed, placed on ice and homogenized 1: 20 (w/v) in Medium I (0.32 M sucrose, 5.0 mM HEPES, 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) buffer. The homogenate was centrifuged at  $2400\times g$  at 4 °C for 15 min to yield the low-speed supernatant (S1) fraction that was used in the assays (inhibition, kinetics and reversibility assays). For each assay, 4–5 independent experiments were carried out in different days, using different animals.

**AChE activity assay** - The cerebral AChE activity was determined according to the method of Ellman *et al.* [20] with some modifications, using acetylthiocholine iodide as a substrate. An aliquot of 100  $\mu\text{L}$  of the S1 (protein of 2.8 mg/mL) was pre-incubated for 2 min at 25 °C in the presence of ebselen at different concentrations (1–100  $\mu\text{M}$ ) in a medium containing TFK 100 mM, pH 7.5. Enzymatic reaction was initiated by adding DTNB to a final concentration of 0.5 mM and acetylthiocholine to a final concentration of 0.8 mM. The rate of hydrolysis of acetylthiocholine iodide was measured at 412 nm through the release of the thiol compound which when reacted with DTNB, produces the color-forming compound thionitrobenzene (TNB). The activity of AChE was expressed as  $\mu\text{mol}$  acetylthiocholine/h/mg protein. The inhibitory effect of ebselen on AChE activity was also tested in pure AChE from electric eel, using the same experimental conditions with 20  $\mu\text{L}$  of AChE (final concentration of 2 U/mL).

**Inhibition Kinetics** - The kinetics of AChE activity inhibition was determined using different concentrations of acetylthiocholine (0.1–2 mM) with or without ebselen at the inhibitory concentration of 50% of AChE activity ( $\text{IC}_{50}$ ). The values of  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  obtained by non-linear regression (Michaelis-Menten plot) were used to analyze the type of inhibition exhibited by ebselen in AChE activity.

**Reversibility of AChE activity inhibition** - The reversibility of AChE activity inhibition by ebselen was evaluated by dialysis, using regenerated cellulose dialysis membranes. The membranes were washed in distilled water at 80 °C for 15 min. Subsequently, they were washed in 10 mM  $\text{NaHCO}_3$  for 30 min and more four times in 10 mM EDTA for 30 min. The membranes were washed again in distilled water at 80 °C for 30 min and stored in 40% ethanol solution at 4 °C. On the day of the experiment, the membranes were washed first with distilled water and then with buffer solution of AChE assay (TFK 100 mM, pH 7.5). For the dialysis kinetic studies, a mixture of S1 plus TFK 100 mM with or without ebselen at  $\text{IC}_{50}$  was prepared and dialyzed under shaking against TFK 100 mM as outer buffer (1 ml of the mixture to 40 ml of outer buffer) at 25 °C. Aliquots of the mixture were taken in time intervals of 0, 20, 40 and 60 min to determine the AChE activity as described above. For the time-concentration-dependence kinetic, test and control solutions were prepared as described before, but without dialysis, and the enzyme activity was measured at 0 and 60 min of incubation.

**Protein Determination** - The protein concentration was measured by the method of Bradford [21] using bovine albumin serum (1 mg/mL) as a standard.

**Statistical Analysis** - Statistical analysis of data concerning the effect of ebselen at different concentrations on AChE activity was performed using one-way ANOVA (analysis of variance) followed by the Newman-Keuls test to *post hoc* comparisons.  $K_m$  and  $V_{\text{max}}$  values from vehicle and ebselen ( $\text{IC}_{50}$ ) were calculated by nonlinear regression using a logarithmic function of the type sigmoid and these parameters were compared by the Student's *t*-test. Data from the reversibility of AChE activity inhibition were analyzed by repeated two-way measures followed by the *post hoc* Bonferroni test.

Data were expressed as means  $\pm$  S.E.M. Values of  $P < 0.05$  were considered to be significant. All analyses were performed using the "GraphPad Software" (GraphPad, San Diego, CA, USA).  $\text{IC}_{50}$  values were calculated by linear regression from individual experiments using "GraphPad Software" (GraphPad software, San Diego, CA, USA). The  $\text{IC}_{50}$  values were reported as means accompanied by their 95% confidence limits. Maximal inhibition ( $I_{\text{max}}$ ) value was calculated at the most effective concentration used.

## RESULTS

**Effect of ebselen on AChE activity** - Ebselen significantly inhibited the cerebral AChE activity with an  $\text{IC}_{50}$  of 29.22 (23.59–36.21)  $\mu\text{M}$  and  $I_{\text{max}}$  of  $97\pm 3\%$ , observed within 2 min of pre-incubation with the enzyme (Fig. 2). The  $\text{IC}_{50}$  and  $I_{\text{max}}$  values obtained with 0 and 10 min of pre-incubation were essentially the same to those observed with 2 min (data not shown).

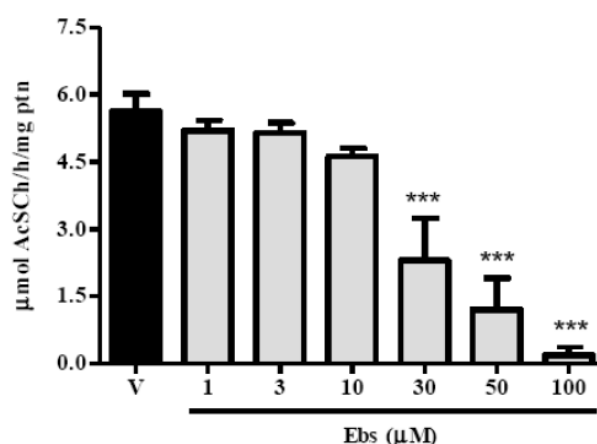


Fig. (2). Effect of different concentrations of ebselen on AChE activity in the rat brain homogenates. Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. for 4–5 independent experiments, performing in different days, using different animals. S1 freshly prepared was used for enzymatic assay. AChE activity was expressed as  $\mu\text{mol}$  acetylthiocholine/h/mg protein. \*\*\*  $P < 0.001$  as compared with the vehicle group (one-way ANOVA/Newman-Keuls). Ebs – ebselen; AcSCh – acetylthiocholine.

Ebselen also inhibited the activity of pure AChE from electric eel with an  $\text{IC}_{50}$  and  $I_{\text{max}}$  of 19.21 (16.91 – 21.83)  $\mu\text{M}$  and  $97\pm 2\%$ , respectively (data not shown), similar to the results found on the rat brain homogenate.

**Inhibition Kinetics** - The kinetic profile of ebselen at  $\text{IC}_{50}$  on AChE activity is shown in Fig. 3. The  $K_m$  obtained with the presence of ebselen was 0.47 mM of acetylthiocholine, which was significantly higher than that of obtained in the absence of ebselen (0.13 mM of acetylthiocholine, Student's *t*-test) (Fig. 4A). In addition, the  $V_{\text{max}}$  values found with or without the presence of ebselen were 3.37 and 5.7  $\mu\text{mol}$  of acetylthiocholine/h/mg protein, respectively (Fig. 4B). The Student's *t*-test showed that ebselen significantly reduced the  $V_{\text{max}}$  value. In this way, ebselen acts as a mixed inhibitor because it increased  $K_m$  and decreased  $V_{\text{max}}$ .

**Reversibility of AChE inhibition by dialysis** - Figure 5A demonstrates that AChE activity inhibited by ebselen at  $\text{IC}_{50}$  was totally recovered within 60 min of dialysis, showing that ebselen acted as a reversible inhibitor of AChE. Importantly, the time- and concentration-dependent experiment showed that without dialysis the activity of AChE remained inhibited by ebselen at  $\text{IC}_{50}$  after 60 min (Fig. 5B).



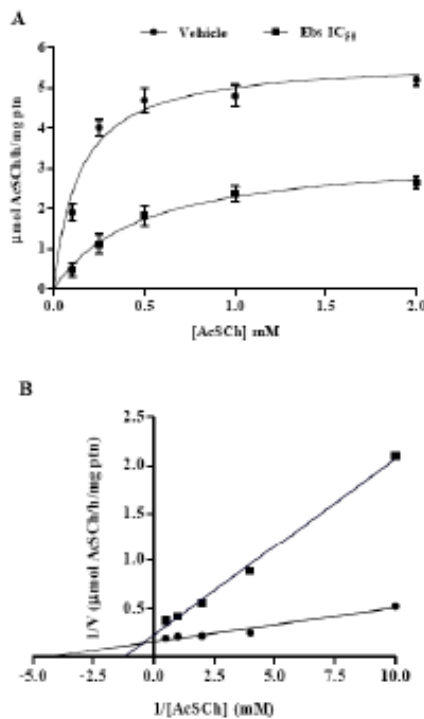


Fig. (3). Effect of ebselen on the enzyme kinetics of AChE shown as a Michaelis-Menten plot (A) or a Lineweaver-Burk plot (B). Ebs – ebselen; AcSCh – acetylthiocholine.

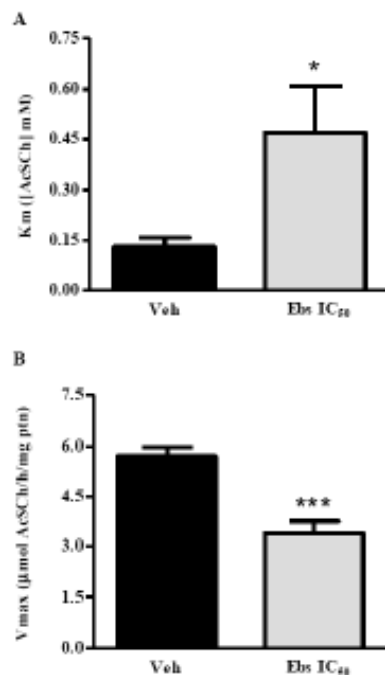


Fig. (4). Effect of ebselen (IC<sub>50</sub>) on K<sub>m</sub> (A) and V<sub>max</sub> (B) of AChE activity obtained by non-linear regression. \*P < 0.05 and \*\*\*P < 0.001 as compared with the respective vehicle (t-Test). Ebs – ebselen; AcSCh – acetylthiocholine.

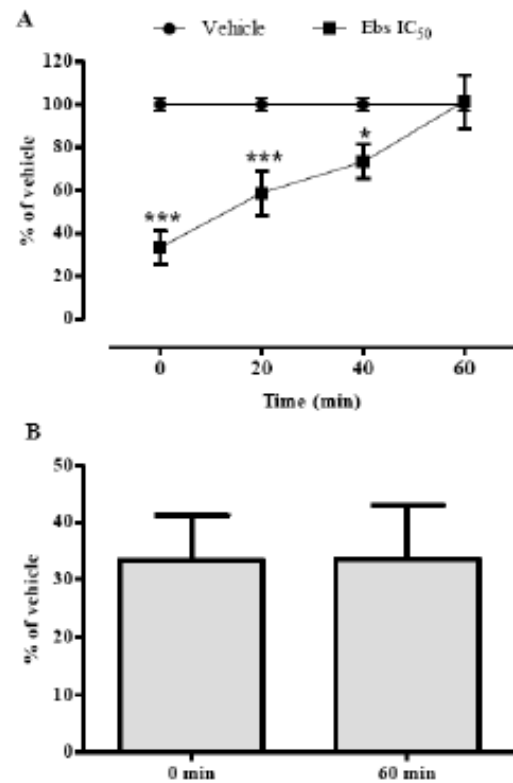


Fig. (5). Reversibility by dialysis of AChE activity inhibited by ebselen at IC<sub>50</sub> (A). \*P < 0.05 and \*\*\*P < 0.001 as compared with the vehicle (Two-way ANOVA of repeated measures/Bonferroni test). Panel B demonstrates the effect of ebselen at IC<sub>50</sub> on AChE activity without dialysis at 0 and 60 min of incubation.

## DISCUSSION

The present study characterized for the first time the inhibitory effect of ebselen on the cerebral AChE activity *in vitro*, which was confirmed in pure AChE from electric eel. This selenium-based compound showed a mixed and reversible inhibition of AChE.

There is a well-established relationship between the cholinergic system and cognitive processes. Since the seventies, pharmacological experiments conducted in both animals [22] and humans [23] have shown learning and memory deficits after anticholinergic treatments. Indeed, the basal forebrain cholinergic cell loss is a consistent feature of AD, which has been related to cognitive deficits [24]. Based on this hypothesis, the most common drug therapy used to treat AD and other cognitive problems focuses on reducing the breakdown of ACh and consequently increasing the cholinergic system transmission, through the inhibition of AChE. The FDA had approved four AChE inhibitors (tacrine, donepezil, rivastigmine and galantamine) for the treatment of AD by the year 2000 [25]. However, these drugs, which are moderately effective in alleviating the symptoms of AD, have poor bioavailability and a number of side effects, including gastrointestinal upsets and hepatotoxicity [26-29].

The importance of AChE in cognitive deficits, especially AD, overtakes the hydrolysis of ACh. Some evidence suggest that AChE may play a key role in the development of the senile plaques, by accelerating  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) aggregation and deposition, one of the most relevant neuropathological characteristics of AD [30-32].



Moreover, this effect can be attenuated by AChE inhibitors, like donepezil and physostigmine [33].

Based on the evidence that the organoselenium compound ebselen inhibits cerebral AChE activity *ex vivo* [12], we demonstrated here this effect *in vitro* using the rat brain homogenates. The observed  $IC_{50}$  value of 29  $\mu$ M was similar to that of found by Luo *et al.* [11] using AChE from electrical eel. This  $IC_{50}$  is higher than those observed for the common AChE inhibitors clinically used, such as donepezil. However, ebselen is bioavailable, blood-brain barrier permeant and safe based on cellular toxicity [2] and Phase I-III clinical trials [34, 35]. In addition, a large body of evidence has confirmed that ebselen exhibits neuroprotective effects on preclinical studies [36, 37, 3]. Recently, Singh *et al.* [38] proposed ebselen as a safe lithium mimetic for treating bipolar disorder, because it inhibits the putative therapeutic target of lithium, the inositol monophosphatase (IMPase) with an  $IC_{50}$  of 1.5  $\mu$ M. Ebselen is also an antioxidant and an inhibitor of cyclooxygenases promoting neuronal survival [6], which corroborates with its IMPase inhibitory effect.

Besides the AChE activity inhibition, ebselen was reported as an inhibitor of iron-induced tau phosphorylation by attenuating divalent metal transporter 1 (DMT1) up-regulation and the cellular iron uptake in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [39]. Abnormal hyperphosphorylation of tau is a critical event in the cascade leading to AD pathology. Clinical studies have reported a strong correlation between the extent of tau phosphorylation and severity of impairments of memory [40, 41]. In this way, the AChE activity inhibition and this effect on tau phosphorylation can account for a possible action of ebselen in improving cognitive deficits. Currently, polypharmacology profile is a desirable property in comparison to drugs that are selective [42], especially in the case of AD, which is a complex multifactorial syndrome due to a number of different but related biological alterations that contribute to its pathogenesis [43, 44].

With respect to the kinetic profile, ebselen showed a mixed inhibition of AChE activity, since it increased  $K_m$  and decreased  $V_{max}$ . Mixed inhibitors act as a non-competitive inhibitors, i.e., they interact with the free enzyme or the enzyme-substrate complex at a site other than the active site but have a greater affinity for one state or the other and the inhibitor alters the affinity of the enzyme to the substrate [45]. It was reported that the non-competitive or mixed mode of AChE activity inhibition is an essential feature to attenuate the aforementioned A $\beta$  aggregation effect of AChE [33, 46, 47]. Therefore, it might be supposed that ebselen prevents the AChE-induced A $\beta$  aggregation based on its AChE activity inhibition mode, an effect that needs confirmation.

The inhibition of AChE by ebselen is reversible, which excludes the possibility that ebselen inhibits AChE activity by covalent binding to this enzyme. The reversible inhibition of AChE activity is desirable, because irreversible inhibitors are generally toxic, leading to muscle overstimulation, as observed in organophosphates poisoning. Moreover, covalent drugs have been disfavored due to risks relating to immunogenicity [48].

The current study demonstrates that ebselen inhibited cerebral AChE activity *in vitro* in a mixed and reversible mode. Given that ebselen has been in clinical trials and considering the antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective actions of this compound and more specifically its effects on tau phosphorylation and AChE activity, ebselen is a potential therapeutic agent for the treatment of AD and other neurodegenerative disorders. Studies dealing with memory behavior tasks are needed to support such hypothesis.

#### ABBREVIATIONS

AChE	=	Acetylcholinesterase
Ach	=	Acetylcholine
AD	=	Alzheimer's disease

FDA	=	Food and Drug Administration
$IC_{50}$	=	Inhibitory concentration of 50% of AChE activity
A $\beta$	=	Amyloid $\beta$ peptide

#### CONFLICT OF INTEREST

The author(s) confirm that this article content has no conflicts of interest.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The financial support by UFSM, CAPES and FAPERGS is gratefully acknowledged. C.W.N and G.Z. are recipients of CNPq fellowships. The authors thank to Dr. J.B. T. Rocha for the donation of the pure AChE from electric eel.

#### REFERENCES

- Dereu NH, Fischer G, Hilboll A, Roemer R, Terlinden. The use of highly enriched Se in metabolic studies of ebselen in man. An NMR investigation. in: A. Wendel (Ed.), Selenium in Biology and Medicine, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany 1989; pp: 163-8.
- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT. Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. Chem Rev 2004; 104: 6255-86.
- Yamagata K, Ichimose S, Miyashita A, Tagami M. Protective effects of ebselen, a seleno-organic antioxidant on neurodegeneration induced by hypoxia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. Neuroscience 2008; 153: 428-35.
- Gabryel B, Malecki A. Ebselen attenuates oxidative stress in ischemic astrocytes depleted of glutathione. Comparison with glutathione precursors. Pharmacol Rep 2006; 58: 381-92.
- Pérez-Ortiz JM, Tranque P, Vaquero CF, *et al.* Glutathione differentially regulate primary astrocyte and glioma cell survival. Involvement of reactive oxygen species and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. J Biol Chem 2004; 279: 8976-85.
- Schewe T. Molecular actions of ebselen an anti-inflammatory antioxidant. Gen Pharmacol 1995; 26: 1153-69.
- Ogawa A, Yoshimoto T, Kikuchi H, *et al.* Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. Cerebrovasc Dis 1999; 9: 112-18.
- Stroke Trials Registry [homepage on the Internet]. Available online: <http://www.strokecenter.org/trials/> (accessed on 27 January 2014).
- ClinicalTrials.gov A service of the U.S. National Institutes of Health [homepage on the Internet]. Available online: <http://clinicaltrials.gov/ct2/home> (accessed on 27 January 2014).
- Luo Z, Sheng J, Sun Y, *et al.* Synthesis and Evaluation of Multi-Target-Directed Ligands against Alzheimer's Disease Based on the Fusion of Donepezil and Ebselen. J Med Chem 2013; 56(22): 9089-99.
- Luo Z, Liang L, Sheng J, *et al.* Synthesis and biological evaluation of a new series of Ebselen derivatives as glutathione peroxidase (GPx) mimics and cholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease. Bioorg Med Chem 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.12.066>
- Mazzanti CM, Spanevello RM, Obregon A, *et al.* Ethidium bromide inhibits rat brain acetylcholinesterase activity *in vitro*. Chem Biol Interact 2006; 162: 121-7.
- Costa MD, Gai BM, Acker CI *et al.* Ebselen reduces hyperglycemia temporarily-induced by diazinon: A compound with insulin-mimetic properties. Chem Biol Interact 2012; 197: 80-6.
- Soreq H, Seidman S. Acetylcholinesterase-new roles for and old actor. Nat Rev Neurosci 2001; 2: 294-302.
- Mesulam MM, Guillozet A, Shaw P, *et al.* Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. Neuroscience 2002; 110: 627-39.
- Cummings JL, Back C. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in alzheimer disease. Am J Geriatr Psychiatry 1998; 6: 64-78.
- Schliebs R, Arendt T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. J Neural Transm 2006; 13: 1625-44.

- [18] Porcel J, Montalban X. Anticholinesterasics in the treatment of cognitive impairment in multiple sclerosis. *J Neurol* 2006; 245: 177-81.
- [19] Engman L, Hallberg A. Expedient Synthesis of Ebselen and Related Compounds. *J Org Chem* 1989; 54: 2964-66.
- [20] Ellman GL, Courtney KD, Andres JrV, *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
- [21] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
- [22] Deutsch JA. The cholinergic synapse and the site of memory. *Science* 1971; 174: 788-95.
- [23] Drachman DA, Leavitt J. Human memory and the central cholinergic system: a relationship to aging. *Arch Neurol* 1974; 30: 113-21.
- [24] Schliebs R, Arendt T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2006; 113: 1625-44.
- [25] Cummings JL. Cholinesterase inhibitors: A new class of psychotropic compounds. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 4-15.
- [26] McGleenon BM, Dynan KB, Passmore AP. Acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 48: 471-80.
- [27] Tabet N. Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: anti-inflammatories in acetylcholine clothing! *Age Ageing* 2006; 35: 336-38.
- [28] Bores GM, Huger FP, Petko W, *et al.* Pharmacological evaluation of novel Alzheimer's disease therapeutics: acetylcholinesterase inhibitors related to galanthamine. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 728-38.
- [29] Forette F, Anand R, Gharabawi G. A phase II study in patients with Alzheimer's disease to assess the preliminary efficacy and maximum tolerated dose of rivastigmine (ExXelon). *Eur J Neurol* 1999; 6: 423-29.
- [30] Inestrosa NC, Alvarez A, Pérez CA, *et al.* Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- $\beta$ -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme. *Neuron* 1996; 16: 881-91.
- [31] Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 1999; 399: A23-31.
- [32] Selkoe DJ. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 2001; 32: 177-80.
- [33] Bartolini M, Bertacci C, Cavrini V, *et al.* Beta-Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase: inhibition studies. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 407-16.
- [34] Yamaguchi T, Sano K, Takakura K, *et al.* Ebselen in acute ischemic stroke: a placebo controlled, double-blind clinical trial. *Stroke* 1998; 29: 12-17.
- [35] Lynch E, Kil J. Development of Ebselen, a Glutathione Peroxidase Mimic, for the Prevention and Treatment of Noise-Induced Hearing Loss. *Semin Hear* 2009; 30: 47-55.
- [36] Porciuncula LO, Rocha JB, Boeck CR, *et al.* Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett* 2001; 299: 217-20.
- [37] Satoh T, Ishige K, Sagara Y. Protective effects on neuronal cells of mouse afforded by ebselen against oxidative stress at multiple steps. *Neurosci Lett* 2004; 371: 1-5.
- [38] Singh N, Halliday AC, Thomas JM, *et al.* A safe lithium mimetic for bipolar disorder. *Nat Commun* 2013; 4: 1332.
- [39] Xie L, Zheng W, Xin N, *et al.* Ebselen inhibits iron-induced tau phosphorylation by attenuating DMT1 up-regulation and cellular iron uptake. *Neurochem Int* 2012; 61: 334-40.
- [40] Ewers M, Buerger K, Teipel SJ, *et al.* Multicenter assessment of CSF-phosphorylated tau for the prediction of conversion of MCI. *Neurology* 2007; 69: 2205-12.
- [41] Van der Vlies AE, Verwey NA, Bouwman FH, *et al.* CSF biomarkers in relationship to cognitive profiles in Alzheimer disease. *Neurology* 2009; 72: 1056-61.
- [42] Frantz S. Drug discovery: playing dirty. *Nature* 2005; 437: 942-3.
- [43] Goedert M, Spillantini MG. A century of Alzheimer's disease. *Science* 2006; 314: 777-81.
- [44] Kim HG, Oh MS. Herbal Medicines for the Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 5775.
- [45] Marangoni AG. Enzyme kinetics: a modern approach. Wiley-Interscience 2003; Chapter 8.
- [46] Castro A, Martinez A. Targeting Beta-Amyloid Pathogenesis Through Acetylcholinesterase Inhibitors. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 4377-87.
- [47] Recanatini M, Valenti P. Acetylcholinesterase Inhibitors as a Starting Point Towards Improved Alzheimer's Disease Therapeutics. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 3157-66.
- [48] Singh J, Petter RC, Bailie TA, *et al.* The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 307-17.

#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesta dissertação permitem concluir que o ebselen inibiu a atividade da AChE cerebral *in vitro* de forma mista e reversível. Visto que o composto orgânico de selênio, ebselen, encontra-se em ensaios clínicos e considerando suas propriedades, antioxidante, anti-inflamatórias e neuroprotetora e, mais especificamente, os seus efeitos na fosforilação da tau e sua inibição na atividade da enzima AChE, o ebselen surge como um potencial agente terapêutico para o tratamento da doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas, porém estudos mais aprofundados são necessários a respeito desta molécula.

## 5. PERSPECTIVAS

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

- ✓ Avaliar o efeito inibitório do ebselen na atividade da AChE ex vivo;
- ✓ Avaliar o efeito nootrópico do ebselen frente ao prejuízo na aquisição, consolidação e evocação da memória causada pela escopolamina;
- ✓ Investigar a ação neuroprotetora do ebselen no modelo de dano cognitivo induzido pelo peptídeo  $\beta$ -amiloide (25-35);
- ✓ Investigar, em diferentes testes comportamentais, o efeito terapêutico do ebselen contra o prejuízo na memória de camundongos induzido por estreptozotocina;
- ✓ Avaliar o efeito protetor do ebselen frente a neuroinflamação e neurodegeneração, ativação da microglia, produção de interleucinas pró-inflamatórias, bem como, investigar os mecanismos moleculares envolvidos no efeito do ebselen nos diferentes modelos animais propostos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, R., et al. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. **Neuropharmacology**, v. 56, p. 779-787, 2009.

ALMEIDA, O.P. Tratamento da doença de Alzheimer: avaliação crítica sobre o uso de anticolinesterásicos. **Arq Neuropsiquiatr**. v. 56, p. 688-96, 1998.

BARTUS, R. T. On neurodegenerative diseases, models, and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis. **Exp Neurol**, v. 163, p. 495-529, 2000.

BENTLEY, P.; DRIVER, J.; DOLAN, R. J. Cholinergic modulation of cognition: insights from human pharmacological functional neuroimaging. **Prog Neurobiol**, v. 94, p. 360-388, 2011.

BENTON, D.; COOK, R. The impact of selenium supplementation on mood. **Biol. Psych.** v. 29, p. 1092–1098, 1991.

BERGER-SWEENEY, J. The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. **Neurosci Biobehav R Rev**, v. 27, p. 401-411, 2003.

BIERER, L. M., et al. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. **J Neurochem**, v. 64, p. 749-760, 1995.

BORTOLATTO, C. F. et al. 2,2'-dithienyl diselenide, an organoselenium compound, elicits antioxidant action and inhibits monoamine oxidase activity in vitro. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 28, p. 677-684, 2013.

BRODATY, H.; SEEHER, K.; GIBSON, L. Dementia time to death: a systematic literature review on survival time and years of life lost in people with dementia. **Int Psychogeriatr**, v. 24, p. 1034-1045, 2012.

BRUNING, C. A. et al. Involvement of the serotonergic system in the anxiolytic-like effect caused by m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. **Behav Brain Res**, v. 205, n. 2, p. 511-517, 2009.

BUCKMAN, T.; SUTPHIN, M. S.; ECKHERT, C. D. A comparison of the effects of dietary selenium on selenoprotein expression in rat brain and liver. **Bioch. et Bioph. Acta**, v. 1163, 176–184, 1993.

CASTANO, A. et al. Low selenium diet increases the dopamine turnover in prefrontal cortex of the rat. **Neurochem. Int.** v.30, p. 549-555, 1997.

CAO, Z, LI, Y. The neuroprotectant ebselen inhibits oxidative DNA damage induced by dopamine in the presence of copper ions. **Neurosci Lett**, v.330, p.69-73, 2002.

CHANDER, P.N. et al. Nephropathy in zucker diabetic fat rat is associated with oxidative and nitrosative stress: prevention by chronic therapy with a peroxynitrite scavenger ebselen. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 15 p. 2391-2403, 2004.

CORRIGAN, F. M. et al. Reductions of zinc and selenium in brain in Alzheimer's disease. **J. J. Trace Elem. Exp. Med.** v. 8, p. 1–5, 1991.

COSTA, M.D. et al. Ebselen reduces hyperglycemia temporarily-induced by diazinon: A compound with insulin-mimetic properties. **Chem. Biol. Interact.** v.197 p. 80-86, 2012.

CUMMINGS, J. L; BACK, C. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in alzheimer disease. **Am J Geriatr Psychiatry**; v. 6, p. 64-78, 1998.

DAWSON, D. A. et al. The neuroprotective efficacy of ebselen (a glutathione peroxidase mimic) on brain damage induced by transient focal cerebral ischaemia in the rat. **Neurosci Lett**, v. 185, p. 65-69, 1995.

DOUCET - PERSONENI, C., et al. A structurebased design approach to the development of novel, reversible acetylcholinesterase inhibitors. **J. Med. Chem**, v. 44, p. 3203-3215, 2001.

DUMONT, E. et al. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Anal Bioanal Chem**, v. 385, n. 7, p. 1304-1323, 2006.

FAO/OMS. Report 7<sup>a</sup> Joint FAO/OMS Expert Consultation. Bangkok. Thailand. Human Vitamin and Mineral Requirements, 2002.

FARINA, M. et al. Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice. **Toxicol Lett**, v. 144, p. 351-357, 2003.

FERGUSSON, E.; HOWARD, R. Donepezil for the treatment of psychosis in dementia with Lewy bodies. **Int J Geriatr Psychiatry**. v. 15, p. 280 – 281, 2000.

FINLEY, J. W.; PENLAND, J. G. Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: clinical and psychological findings. **J. Trace Elements in Experiment. Med.** v. 11, 1–27, 1998.

FLINCKER, L. Eficácia do tratamento farmacológico da demência, Rev. **Bras. Psiquiatr.** v. 24, p. 11-24, 2002.

FÜRSTENAU, C. R. et al. The effect of ebselen on adenine nucleotide hydrolysis by platelets from adult rats. **Chem Biol Interact**, v.30, p.93-99, 2004.

GE, K. et al. Keshan disease-an endemic cardiomyopathy in China. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol** v. 401, p.1-15, 1983.

GROSSBERG, G.T. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: getting on and staying on. **Curr The Res.** v. 64, 216–235, 2003.

HAREL, M. et al. Quaternary ligand binding to aromatic residues in the active-site gorge of acetylcholinesterase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 90, p. 9031-9035, 1993.



HAREL, M. et al. Conversion of acetylcholinesterase to butyrylcholinesterase: Modeling and mutagenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.89, p. 10827-10831, 1992.

HERIN, G.A.; DU, S.; AIZENMAN, E. The neuroprotective agent ebselen modifies NMDA receptor function via the redox modulatory site. **J Neurochem.** v. 78, p. 1307–1314, 2001.

IMAI, H. et al. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. **Free Rad Biol Med**, v. 34, p.56-63, 2003.

ISHRAT, T., et al. Selenium prevents cognitive decline and oxidative damage in rat model of streptozotocin-induced experimental dementia of Alzheimer's type. **Brain Res**, v. 1281, p. 117-127, 2009.

JANCA, A., et al. WHO/WFN Survey of neurological services: a worldwide perspective. **J Neurol Sci**, v. 247, p. 29-34, 2006.

KALARIA, R. N., et al. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors. **Lancet Neurol**, v. 7, 812-826, 2008.

KIM, Y. Y.; MAHAN, D. C.: Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. **J. Anim. Sci.**, v.79, p.942–948, 2001.

KRONMAN, C. et al. The "back door" hypothesis for product clearance in acetylcholinesterase challenged by site-directed mutagenesis. **J. Biol. Chem.** v. 269, p. 27819-2782, 1994.

LEVIN, E. D.; REZVANI, A. H. Development of nicotinic drug therapy for cognitive disorders. **Eur J Pharmacol.** v. 393, p. 141–146, 2000.

LYNCH, E.; KIL, J. Development of Ebselen, a Glutathione Peroxidase Mimic, for the Prevention and Treatment of Noise-Induced Hearing Loss. **Seminars in Hearing.** v. 30, p. 047–055, 2009.



MAZZANTI, C. M, et. al. Ethidium bromide inhibits rat brain acetylcholinesterase activity in vitro. **Chem. Biol. Interact.** v. 162 p. 121-127, 2006.

MEOTTI, F. C. et al. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environ. Res.** v. 94, n. 3, p. 276-282, 2004.

MESULAM, M. M, et al. Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyse acetylcholine. **Neuroscience**, v. 110 p. 627–639, 2002.

MOUSSAOUI, S. et al. The antioxidant ebselen prevents neurotoxicity and clinical symptoms in a primate model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 166, p. 235-245, 2000.

MOXON, A. L.; RHIAN, M. Selenium poisoning. **Physiol. Rev.** v. 23, p. 305–337, 1943.

NAMURA, S. et al. 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.

NARAJJI, C.; KARVEKAR, M. D.; DAS, A. K. Biological importance of organoselenium compounds. **Indian J. Pharm. Sci.**, v. 69, p. 344–351, 2007.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Diphenyl Diselenide a Janus-Faced Molecule. **J Braz Chem Soc**, v. 21, p. 2055 - 2071, 2010.

NOGUEIRA, C. W. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflammation Research**, v. 52, n. 2, p. 56-63, Feb 2003.

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. T. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Arch Toxicol**, v. 85, n. 11, p. 1313-1359, 2011.

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

NORDBERG, A. Neuroreceptor changes in Alzheimer disease. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, v. 4, p. 303-328, 1992.

OGAWA, A. et al. Ebselen in acute middle cerebral artery occlusion: a placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Cerebrovasc Dis*, v. 9, p. 112–118, 1999.

PARNHAM, M.J.; KINDT, S. A novel biologically-active organoselenium compound 3. Effects of PZ-51 (ebselen) on glutathione-peroxidase and secretory activities of mouse macrophages. *Biochem Pharmacol* v.33 p. 3247–3250, 1984.

PARNHAM, M. J.; GRAF, E. Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. *Biochem Pharmacol*, v.36, p.3095-3102. 1987.

PARNHAM M. J.; SIES H. Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. *Exp. Opin. Invest. Drugs*. v. 9, p. 607-619, 2000.

PATAI'S CHEMISTRY OF FUNCTIONAL GROUPS. The Chemistry of Organic Selenium and Tellurium Compounds. Rappoport Z (Ed), **John Wiley & Sons Ltd**, p 61. 2012.

PORCEL, J.; MONTALBAN, X. Anticholinesterasics in the treatment of cognitive impairment in multiple sclerosis. *J. Neurol*. v. 245, p. 177–181, 2006.

PORCIUNCULA, L. O., et al. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett*, v. 299, p. 217-220, 2001.

RAYMAN, M. P. Food-chain selenium and human health: emphasis on intake. *Brit J Nutr*, v. 100, p. 254-268, 2008.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. *Lancet*, v. 356, p. 233-241, 2000.

RAYMAN, M. et al. Impact of Selenium on Mood and Quality of Life: A Randomized, Controlled Trial. *Biol. Psych*. v. 59, p.147–154, 2006.

RIZZO, S. et al. Multi-target strategy to address Alzheimer's disease: design, synthesis and biological evaluation of new tacrine-based dimers. **Eur. J. Med. Chem.**, v.46, p. 4336-4343, 2011.

ROSSATO, J. I. et al. Ebselen blocks the quinolinic acid-induced production of thiobarbituric acid reactive species but does not prevent the behavioral alterations produced by intra-striatal quinolinic acid administration in the rat. **Neurosci Lett**, v.318, p. 137-140, 2002.

SAVEGNAGO, L. et al. Mechanisms involved in the antinociceptive effect caused by diphenyl diselenide in the formalin test. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 60, n. 12, p. 1679-1686, 2008.

SCHEWE, T. Molecular actions of ebselen – an antiinflammatory antioxidant. **Gen Pharmac**, v. 6 p. 1153-69, 1995.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. **Behav Brain Res**, 221, 555-563, 2011.

SCHLIEBS, R.; ARENDT, T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. **J Neural Transm**, v. 113, p. 1625-1644, 2006.

SCHWEIZER, U. et al. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. **Brain. Res. Rev.** v. 45, p. 164–178, 2004.

SIES H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. **Free Rad. Biol. Med.** v. 14, p. 313-323, 1993.

SINGH, J. et al. The resurgence of covalent drugs. **Nat Rev Drug Discov.** v.10, p. 307–317, 2011.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for and old actor. **Nat. Rev. Neurosci**; v. 2, p. 294–302, 2001.

SOTRIFFER, C. et al. Docking and scoring functions and virtual screening in Burger's medicinal chemistry and drug discovery, John Wiley and Sons. **Inc, New York**, v. 1, p. 281-332, 2003.

STIX, G. Alzheimer's: forestalling the darkness. **Sci Am**, v. 302, p. 50-57, 2010.

SUSSMAN, J. L.; HAREL, M.; SILMAN, I. Three-dimensional structure of acetylcholinesterase and of its complexes with anticholinesterase drugs. **Chem. Biol. Interact.**, v. 87, 187-97, 1993.

UETRECHT, J. Screening for the potential of a drug candidate to cause idiosyncratic drug reactions. **Drug Discov.** v. 8, p. 832–837, 2003.

WENDEL, A. et al. A novel biologically active seleno-organic compound--II. Activity of PZ 51 in relation to glutathione peroxidase. **Biochem Pharmacol**, v.33, p.3241-3245. 1984.

WENDEL, A.; OTTER, R.; TIEGS, G. Inhibition by ebselen of microsomal NADPH-cytochrome P450-reductase in vitro but not in vivo. **Biochem Pharmacol.** v. 35 p. 2995-2997, 1986.

WHANGER, P. D. Selenium and the brain: a review. **Nutr. Neurosci.** v. 4, p. 81–97, 2001.

XIE, L. et al. Ebselen inhibits iron-induced tau phosphorylation by attenuating DMT1 up-regulation and cellular iron uptake. **Neurochem Int**, v. 61, p. 334-340, 2012.

XIONG, S. et al. Seleno-L-methionine protects against beta-amyloid and iron/hydrogen peroxide-mediated neuron death. **Antioxid Redox Signal**, v. 9, p. 457-467, 2007.

YAMAGUCHI, T. et al. Ebselen In Acute Ischemic Stroke: A Placebo-Controlled, Doubleblind Clinical Trial. **Stroke**, v.29, p.12-17, 1998.

ZASSO, F. B. et al. On the mechanisms involved in antinociception induced by diphenyl diselenide. **Environ Toxicol Phar**, v. 19, n. 2, p. 283-289, 2005.

## 7. APÊNDICE

NO QUE SE REFERE AOS ASPECTOS EXPERIMENTAIS, SABE-SE QUE A MEDIDA DA ATIVIDADE DA ACHE MEDE A FORMAÇÃO DE TIUCOLINA, A QUAL INTERAGE COM 5,5'-DITIO-BIS-(2-NITROBENZÓICO) (DTNB), FORMANDO UM PRODUTO DE COLORAÇÃO AMARELA, O 2-NITRO-5-TIOBENZOATO (TNB). ALÉM DISSO, SABE-SE QUE O EBSELEN PODE OXIDAR TIÓIS, DESSA FORMA, NÃO SE PODE DESCARTAR REAÇÕES PARALELAS ENTRE O EBSELEN E A TIUCOLINA IMPEDINDO A REAÇÃO COM O DTNB, O CARACTERIZARIA UM FALSO POSITIVO. NESTE SENTIDO, É POSSÍVEL QUE A OXIDAÇÃO DO GRUPO TIOL DA TIUCOLINA PELO EBSELEN POSSA SUPERESTIMAR UM EFEITO INIBITÓRIO DESTE COMPOSTO SOBRE A ACHE. COM O INTUITO DE DESCARTAR POSSÍVEIS VIÉS TÉCNICOS, REALIZAMOS UM EXPERIMENTO COM AUSÊNCIA DO SUBSTRATO, ACETILTUCOLINA, E CONCLUÍMOS QUE NÃO OCORREU A FORMAÇÃO DE ARTEFATOS NA AMOSTRA, ELIMINANDO QUALQUER DÚVIDA SOBRE O REAL EFEITO DO EBSELEN NA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE.