

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

Natália da Silva Jardim

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO E DO  
DISSELENETO DE *m*-TRIFLUORMETIL DIFENILA EM UM MODELO  
DE DIETA HIPERCALÓRICA EM CAMUNDONGOS JOVENS**

Santa Maria, RS  
2021



**Natália da Silva Jardim**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO E DO  
DISSELENETO DE *m*-TRIFLUORMETIL DIFENILA EM UM MODELO DE  
DIETA HIPERCALÓRICA EM CAMUNDONGOS JOVENS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**

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

Santa Maria, RS  
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Jardim, Natália da Silva  
EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO E DO  
DISSELENETO DE m-TRIFLUORMETIL DIFENILA EM UM MODELO DE  
DIETA HIPERCALÓRICA EM CAMUNDONGOS JOVENS / Natália da  
Silva Jardim.- 2021.  
111 p.; 30 cm

Orientadora: Cristina Wayne Nogueira  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, RS, 2021

1. Exercício 2. Selênio 3. Memória 4. Extresse  
Oxidativo 5. Inflamação I. Wayne Nogueira, Cristina II.  
Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, NATÁLIA DA SILVA JARDIM, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

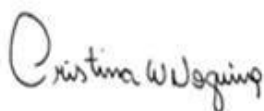


**Natália da Silva Jardim**

**EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO E DO  
DISSELENETO DE *m*-TRIFLUORMETIL DIFENILA EM UM MODELO DE  
DIETA HIPERCALÓRICA EM CAMUNDONGOS JOVENS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**

**Aprovado em 21 de maio de 2021:**



**Cristina Wayne Nogueira, Dr<sup>a</sup> (UFSM) - Videoconferência  
(Presidente/Orientadora)**



**Ana Flávia Furian, Dr<sup>a</sup> (UFSM) - Videoconferência**



**Camila Simonetti Pase, Dr<sup>a</sup> (UNIPAMPA) - Videoconferência**



**Gustavo Petri Guerra, Dr (UNIPAMPA) - Videoconferência**



**Roselia Maria Spanevello, Dr<sup>a</sup> (UFPel) - Videoconferência**

Santa Maria, RS  
2021



Não há exemplo maior de dedicação do que a da nossa família.  
Com carinho dedico esta tese aos meus pais Jorge e Vera os quais sempre me apoiaram em todas as minhas escolhas e aos meus irmãos Fernando, Fernanda e Eduardo por estarem sempre ao meu lado. Sem vocês nada seria possível.



## AGRADECIMENTOS

*Tão importante quanto o trabalho realizado é a gratidão a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente para que ele fosse possível...*

*Agradeço a Deus, pela vida e por ter permitido que eu tivesse saúde e determinação para não desanimar durante a realização desta tese.*

*À minha família, minha maior gratidão. Aos meus pais Jorge e Vera, meus exemplos de conduta e perseverança. Sou grata por todo apoio, carinho e dedicação; obrigada por nunca terem medido esforços para me proporcionar todo suporte necessário à minha caminhada e pela oportunidade de ter um ensino de qualidade durante todo o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Os dois maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos. Aos meus irmãos Fernando, Fernanda e Eduardo pelo companheirismo, pela cumplicidade e pelo apoio em todos os momentos. Obrigada.*

*À minha orientadora, professora Dra. Cristina um exemplo de mulher e de profissional. Agradeço pela oportunidade e por ser parte fundamental do meu desenvolvimento científico. Obrigada por todos os ensinamentos, pela ajuda e incentivo, pela paciência e dedicação comigo desde a iniciação científica até a conclusão do doutorado. Se eu levar um pouco de ti certamente encerro esta etapa como pessoa e profissional melhor.*

*Aos meus colegas do Lab Cris, durante todos esses anos pessoas incríveis se fizeram presentes em minha rotina. À Sabrina que passou de minha primeira IC no mestrado para amiga e colega de trabalho no doutorado, obrigada pela cumplicidade e por estar sempre comigo nos surtos e nas risadas, tua participação foi muito importante para conclusão desse trabalho. À Flávia minha segunda IC, agradeço por toda ajuda e compreensão. À Milene que sempre esteve disponível para me ajudar e tornou-se uma grande amiga. Desejo todo sucesso na caminhada que vocês escolherem. Os colegas atuais do Lab, Bruna, Isabela, Juliano, Luiza, Renata e Vanessa: cada um, de alguma forma colaborou para que essa etapa fosse concluída, por isso: obrigada! Agradeço todos os colegas antigos do Lab, em especial aqueles que estiveram sempre do meu lado e que agora são grandes amigos da vida: Caroline, Marcel, Marlon e Paulo César.*

*Aos meus amigos do Lab GZ, o professor Dr Gilson um excelente profissional, agradeço pela síntese dos compostos orgânicos de selênio juntamente com seus alunos. Durante esses anos fiz muitos amigos nesse Lab, em especial, Adriano, Guilherme e Jean obrigada pela amizade e parceria, por tornar a rotina mais leve e o riso mais fácil.*

*Agradeço a professora Simone pela oportunidade de parceria de trabalho.*

*Aos meus amigos que me acompanham e torcem por mim.*

*À banca, Professores Ana Flávia, Camila, Gustavo e Roselia pela disposição em avaliar meu trabalho.*

*Ao Rinaldo pelo cuidado com os animais. Aos professores e funcionários do Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica. À CAPES, pelo auxílio financeiro e à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização desse curso.*

*Enfim, sou imensamente grata por todas as oportunidades que tive, por todo o meu processo de aprendizado e até pelos obstáculos encontrados. Agradeço por conseguir concluir essa etapa tão importante para meu crescimento, mesmo em momentos difíceis pandemia.*



**Talvez não tenha conseguido  
fazer o melhor, mas lutei para  
que o melhor fosse feito.**

**-Marthin Luther King**





## RESUMO

### EFEITO NEUROPROTETOR DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO E DO DISSELENETO DE *m*-TRIFLUORMETIL DIFENILA EM UM MODELO DE DIETA HIPERCALÓRICA EM CAMUNDONGOS JOVENS

AUTORA: NATÁLIA DA SILVA JARDIM

ORIENTADORA: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA

O processo de transição nutricional tem gerado repercussões negativas na saúde populacional. O crescente aumento do consumo de alimentos e bebidas com alta densidade energética e baixo valor nutricional promove danos ao organismo, incluindo prejuízo nas funções cognitivas. Estratégias terapêuticas para controlar e/ou prevenir danos induzidos pelo consumo excessivo de alimentos hipercalóricos são necessárias. O exercício aeróbico é uma terapia não-farmacológica com ação antioxidante e efeitos na melhora da função cognitiva em modelos animais de doenças neurodegenerativas. O composto orgânico de selênio, disseleneto de *m*-trifluormetil-difenila) (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>, possui baixa toxicidade e propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória e anti-apoptótica, no sistema nervoso central. Com isso, o objetivo desta tese foi avaliar os efeitos do exercício de natação e do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> sobre a aprendizagem e memória de camundongos jovens expostos a uma dieta hipercalórica, elucidando os possíveis mecanismos envolvidos em ambas as terapias. Inicialmente, tanto no **artigo** como no **manuscrito** os camundongos Swiss machos (21 dias pós-natal) foram expostos a uma dieta hipercalórica contendo a adição de 20% lipídeos + 20% carboidratos durante 28 dias de protocolo experimental (CEUA: 7134140318 – 8990220420). Os resultados do **artigo** demonstraram que o exercício de natação de intensidade moderada realizado durante 28 dias (5 vezes por semana), protegeu contra os prejuízos nas memórias de localização e reconhecimento do objeto e na memória espacial em camundongos jovens alimentados com uma dieta hipercalórica. O exercício de natação demonstrou seu efeito antioxidante através da diminuição do estresse oxidativo e da modulação da via de sinalização Keap1/Nrf2/HO-1 no hipocampo dos camundongos expostos a dieta hipercalórica. Ainda, os resultados indicaram que o exercício de natação restaurou os níveis hipocampais da proteína mtTFA. A modulação positiva das proteínas Keap1/Nrf2/HO-1 e mtTFA contribuiu para os efeitos do exercício de natação sobre os testes comportamentais de aprendizagem e memória. No **manuscrito**, os resultados revelaram que o tratamento com (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>, na dose de 5 mg/kg por 7 dias (via intragástrica), apresentou efeitos positivos na melhora dos prejuízos nas memórias de localização e reconhecimento do objeto em camundongos expostos a uma dieta hipercalórica. Os efeitos anti-inflamatórios do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> foram demonstrados pela diminuição dos níveis hipocampais das proteínas IL-1β, COX-2 e GFAP, os quais foram aumentados pela exposição a dieta hipercalórica. Para complementar a ação anti-inflamatória, os resultados mostraram que a administração do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> modulou a via de sinalização das MAPKs através da diminuição da fosforilação das proteínas p38, JNK e ERK. Além disso, o composto (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> reverteu o aumento dos níveis das proteínas apoptóticas Bax e PARP clivada, e a diminuição da anti-apoptótica Bcl-2 em hipocampo de camundongos jovens expostos a dieta hipercalórica. Ambas as terapias foram eficazes em proteger contra o aumento de tecido adiposo causado pela exposição à dieta. Por fim, os resultados dessa tese contribuíram para a compreensão dos mecanismos neuroprotetores pelos quais o exercício de natação e o composto (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> melhoram os prejuízos de aprendizagem e memória induzidos pela exposição a uma dieta hipercalórica em camundongos jovens, sendo possíveis estratégias (não-farmacológica e farmacológica) para o tratamento destas condições.

**Palavras-chave:** Exercício. Selênio. Memória. Estresse Oxidativo. Inflamação. Apoptose.



## ABSTRACT

### NEUROPROTECTIVE EFFECT OF SWIMMING EXERCISE AND *m*-TRIFLUORMETHYL DIPHENYL DISELENIDE IN A HYPERCALORIC DIET MODEL IN YOUNG MICE

AUTHOR: NATÁLIA DA SILVA JARDIM  
ADVISOR: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA

The nutrition transition process has generated negative impacts on population health. The increasing consumption of foods and beverages with higher energy density and lower nutritional value promotes damage to the body, including cognitive functions. Therapeutic strategies to control and or prevent injuries induced by excessive consumption of high-calorie foods are necessary. Aerobic exercise is a non-pharmacological strategy that shows positive effects on oxidant status and cognitive function in models of neurodegenerative diseases. *m*-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> is a low-toxicity organoselenium compound with anti-inflammatory and anti-apoptotic properties in the central nervous system. This thesis aimed to evaluate the swimming exercise and (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> effects on the memory of young mice exposed to a high-calorie diet, elucidating the possible mechanisms involved in the neuroprotective action of both therapies. Initially, both in the **article** and **manuscript** male Swiss mice (21 postnatal days) were exposed to a high-calorie diet supplemented with 20% lipids + 20% carbohydrate for 28 days (CEUA: 7134140318 – 8990220420). The **article** results demonstrate that the moderate-intensity swimming exercise performed for 28 days protected against impairments of spatial, location, and recognition memories in young mice fed a high-calorie diet. A decrease in oxidative stress and the modulation of the Keap1/Nrf2/HO-1 pathway were found in the hippocampus of exercised mice exposed to a high-calorie diet. Swimming exercise modulated the hippocampal levels of mtTFA protein. The positive modulation of Keap1/Nrf2/HO-1 and mtTFA proteins contributed to the swimming exercise effects on behavioral memory tests. The **manuscript** results reveal that (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>, at a dose of 5 mg/kg for 7 days (intra-gastric route), improved location and recognition memory in young mice exposed to a high-calorie diet. (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> anti-inflammatory effects were demonstrated by decreasing the hippocampal IL-1 $\beta$ , COX-2, and GFAP protein levels, which were increased after exposure to a high-calorie diet (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> modulated the MAPK pathways by decreasing the levels of p38, JNK, and ERK phosphorylation. Besides, (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> restored the increase in the levels of apoptotic proteins Bax and cleaved PARP and the decrease in the anti-apoptotic protein Bcl-2 in the hippocampus of young mice exposed to a high-calorie diet. Both therapies were effective against fatty tissue accumulation caused by exposure to a high-calorie diet. In conclusion, this thesis help to understanding how neuroprotective mechanisms contribute to swimming exercise and (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> positive effects on memory of mice exposed to a high-calorie diet. Thus, both therapies are possible strategies (non-pharmacological and pharmacological) to treat memory damage caused by a high-calorie diet.

**Keywords:** Exercise. Selenium. Memory. Oxidative Stress. Inflammation. Apoptosis.



## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1 -	Classificação dos principais tipos de memória.....	17
Figura 2 -	Via de sinalização Keap1/Nrf2 em condições normais e de estresse oxidativo...	21
Figura 3 -	Vias de indução da apoptose.....	24
Figura 4 -	Benefícios da ingestão do micronutriente selênio, bem como os danos relacionados seus aos níveis baixos no organismo.....	30
Figura 5 -	Estrutura química do disseleneto de difenila (PhSe) <sub>2</sub> e do disseleneto de <i>m</i> -trifluormetil difenilafenila ( <i>m</i> -CF <sub>3</sub> -PhSe) <sub>2</sub> .....	32

### CONCLUSÃO

Figura 6 -	Esquema geral dos principais mecanismos envolvidos nos efeitos do exercício de natação e do ( <i>m</i> -CF <sub>3</sub> -PhSe) <sub>2</sub> em camundongos alimentados com uma dieta hipercalórica durante os períodos iniciais de vida.....	90
------------	--	----

### ARTIGO

Figure 1 -	Schematic illustration of the experimental protocol.....	39
Figure 2 -	Schematic view of the behavior tests carried out in this study.....	40
Figure 3 -	Effects of moderate-intensity swimming protocol on food intake and relative fat weight of mice exposed to a high-calorie diet.....	42
Figure 4 -	Effects of moderate-intensity swimming protocol on the MWM test of mice exposed to a high-calorie diet.....	44
Figure 5 -	Effects of moderate-intensity swimming protocol on the training session (OLT and ORT) of mice exposed to a high-calorie diet.....	45
Figure 6 -	Effects of moderate-intensity swimming protocol on the OLT and ORT of mice exposed to a high-calorie diet. OLT (2 h after training), STM (1.5 h after training), and LTM (24 h after training).....	45
Figure 7 -	Effects of moderate-intensity swimming protocol on TBARS and NPSH levels in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet.....	46
Figure 8 -	Effects of moderate-intensity swimming protocol on HO-1, NRF2 levels and NRF2/Keap-1 ratio in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet.....	47
Figure 9 -	Effects of moderate-intensity swimming protocol on PGC-1 $\alpha$ and mtTFA levels in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet.....	48
Figure 10-	Summary of moderate-intensity swimming protocol effects on the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet during the early-life period.....	49

### MANUSCRITO

Figure 1 -	Schematic representation of this study.....	69
Figure 2 -	Effects of ( <i>m</i> -CF <sub>3</sub> -PhSe) <sub>2</sub> on the relative fat mass, body weight, and memory performance of mice exposed to a high-calorie diet.....	70
Figure 3 -	Effects of ( <i>m</i> -CF <sub>3</sub> -PhSe) <sub>2</sub> on the apoptotic protein levels in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet.....	71

Figure 4 -	Effects of ( <i>m</i> -CF <sub>3</sub> -PhSe) <sub>2</sub> on the inflammatory protein levels in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet.....	<b>72</b>
Figure 5 -	Effects of ( <i>m</i> -CF <sub>3</sub> -PhSe) <sub>2</sub> on the p38 in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet.....	<b>73</b>
Figure 6 -	Effects of ( <i>m</i> -CF <sub>3</sub> -PhSe) <sub>2</sub> on the GFAP in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet.....	<b>74</b>
Figure 7 -	Summary of ( <i>m</i> -CF <sub>3</sub> -PhSe) <sub>2</sub> effects on the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet during the early-life period.....	<b>75</b>

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

Table 1 -	Nutritional composition of sources used to high-calorie diet preparation.....	38
Table 2 -	Effects of swimming training on locomotor parameters of mice exposed to a high-calorie diet during the early-life period.....	43
Table 3 -	Effects of moderate-intensity swimming on spontaneous locomotor parameters of mice exposed to a high-calorie diet during the early-life period	45
Table S1 -	Antibodies used in this study.....	53
Table S2 -	Effect of swimming training on the body weight gain of mice exposed to a high-caloric diet.....	53

### MANUSCRITO

Table 1 -	Effects of ( <i>m</i> -CF <sub>3</sub> -PhSe) <sub>2</sub> on spontaneous locomotor parameters of mice exposed to a high-calorie diet.....	69
Table S1 -	Antibodies used in this study.....	78





## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A -	Carta de aprovação do projeto de pesquisa Avaliação da ação do exercício de natação em reverter o dano cognitivo induzido pela administração de substâncias hipercalóricas em camundongos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) .....	<b>109</b>
ANEXO B -	Carta de aprovação do projeto de pesquisa Efeito do disseleneto de <i>m</i> -trifluormetil difenila contra o dano na memória e aprendizagem induzidos por uma dieta modificada na sua composição de lipídeos/carboidratos em camundongos jovens machos e fêmeas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) .....	<b>110</b>
ANEXO C -	Autorização para reprodução do artigo científico intitulado: Nuclear Factor [Erythroid-derived 2]-like 2 and Mitochondrial Transcription Factor A Contribute to Moderate-intensity Swimming Effectiveness against Memory Impairment in Young Mice Induced by Concomitant Exposure to a High-calorie Diet during the Early Life Period.....	<b>111</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

$(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$	Disseleneto de <i>m</i> -trifluormetil difenila
(PhSe) <sub>2</sub>	Disseleneto de difenila
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
BAX	Proteína X associada ao BCL-2
BCL-2	Do inglês “B-cell lymphoma 2”
BCL-xL	Do inglês “B-cell lymphoma 2-extra large”
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
COVID-19	Doença do Coronavírus
COX-2	Enzima ciclooxigenase-2
CREB	Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta ao cAMP
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERA	Elementos de resposta antioxidante
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GFAP	Proteína fibrilar ácida
HO-1	Heme oxigenase-1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-6	Interleucina 6
JNK	Quinase c-Jun N-terminal
KEAP1	Proteína 1 associada à ECH tipo Kelch
LAM	Labirinto aquático de Morris
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mtTFA	Fator de transcrição mitocondrial A
NF $\kappa$ $\beta$ p65	Factor nuclear kappa $\beta$ subunidade p65
NO $\cdot$	Óxido nítrico
NRF2	Fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2
p38	Proteína quinase ativada por mitógeno p38
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase-1
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TLO	Teste de localização do objeto
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TRO	Teste de reconhecimento do objeto



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 CONSUMO DE ALIMENTOS COM ALTA DENSIDADE ENERGÉTICA E SUAS CONSEQUÊNCIAS .....	14
1.2 MEMÓRIA: DEFINIÇÕES GERAIS .....	16
1.3 ALTERAÇÕES DIETÉTICAS E MEMÓRIA: EXPLORANDO OS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS .....	18
1.3.1 <i>Regulação redox: estresse oxidativo e a via de sinalização Keap1/Nrf2</i> .....	19
1.3.2 <i>Inflamação</i> .....	22
1.3.3 <i>Apoptose</i> .....	24
1.4 BENEFÍCIOS DO EXERCÍCIO COMO UMA TERAPIA NÃO-FARMACOLÓGICA .....	26
1.5 SELÊNIO: UM MICRONUTRIENTE ESSENCIAL AO ORGANISMO .....	28
1.5.1 <i>Compostos orgânicos de selênio: Disseleneto de m-trifluormetil difenila</i> .....	30
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>3 DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>35</b>
3.1 ARTIGO.....	36
<i>Nuclear Factor [Erythroid-derived 2]-like 2 and Mitochondrial Transcription Factor A         Contribute to Moderate-intensity Swimming Effectiveness against Memory Impairment in         Young Mice Induced by Concomitant Exposure to a High-calorie Diet during the Early         Life Period</i> .....	36
3.2 MANUSCRITO .....	54
<i>m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide restores memory impairment and hippocampal         inflammatory and apoptotic pathways in young mice exposed to a high-calorie diet</i> .....	54
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>90</b>
<b>6 PERSPECTIVAS.....</b>	<b>91</b>
<b>7 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>109</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSUMO DE ALIMENTOS COM ALTA DENSIDADE ENERGÉTICA E SUAS CONSEQUÊNCIAS

Nos últimos anos, o processo de transição nutricional tem gerado repercussões negativas na saúde populacional (DANTAS, 2016). Entre os principais fatores envolvidos na mudança da qualidade dos hábitos alimentares, destaca-se o fácil acesso a alimentos e bebidas com maior densidade energética e menor valor nutricional (BEZERRA et al., 2017). A maioria desses alimentos contendo principalmente gorduras saturadas e carboidratos refinados são aqueles industrializados e com alta palatabilidade; essas características contribuem para o crescente aumento da ingestão desses alimentos calóricos (VANDEVIJVERE et al., 2015). Além disso, este padrão alimentar assemelha-se a dieta conhecida como “dieta ocidental”, a qual é caracterizada pelo elevado consumo de alimentos calóricos e com alto teor de gordura (CORDAIN et al., 2005).

O excessivo consumo dos macronutrientes lipídios e carboidratos, aliado a predominância do sedentarismo da população em geral tornou-se um problema de saúde pública; visto que estudos indicam prejuízos à saúde decorrentes de uma alimentação baseada em ultraprocessados, incluindo bebidas açucaradas e alimentos do tipo *fast-food*, os quais contém elevados níveis de sódio, açúcar e gorduras saturadas (LOUZADA et al., 2015). No Brasil, os hábitos alimentares de crianças e adolescentes caracterizam-se por incluir alimentos ricos em gordura saturada e açúcares (VASCONCELOS et al., 2016). Nesse sentido, no Brasil já foram reportadas associações significativas do consumo de alimentos industrializados com a síndrome metabólica em adolescentes, com dislipidemias em crianças e com a obesidade em todas as idades (RAUBER et al., 2015; TAVARES et al., 2011; VOTRUBA et al., 2014).

A alimentação assim como estilo de vida estão intimamente ligadas a alta prevalência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como a obesidade, as dislipidemias, hipertensão, diabetes, cardiopatias, resistência à insulina e a doença hepática gordurosa não alcoólica, além da diminuição da qualidade de vida da população (FERREIRA et al., 2005; FRANÇA et al., 2012; TE MORENGA et al., 2013; WHITE et al., 2013). As DCNT são doenças que se desenvolvem no decorrer da vida, de longa duração e consideradas a principal causa de morte e incapacidade prematura em grande parte dos países do continente americano, incluindo o Brasil; sendo que uma má alimentação afeta diretamente o surgimento e

agravamento dessas doenças (OPAS/OMS) que ocorrem tanto em roedores quanto em humanos com massa corporal elevada.

Os efeitos deletérios ao organismo provocados por dietas com sobrecarga de gordura ou carboidratos já estão bem descritos na literatura. Um longo período de administração de dietas contendo uma variação de 30% a 60% de lipídios e/ou carboidratos induzem desde obesidade (CHEN e LIN, 2021), resistência à insulina (JORQUERA et al., 2021), diabetes mellitus, aumento da resposta inflamatória e apoptótica (LU, Q. et al., 2021), dano oxidativo (SUN et al., 2021), esteatose hepática (BARBOSA-DA-SILVA et al., 2014) até disbiose intestinal (ZHANG, Z. et al., 2021) entre outras doenças em modelos animais. Sendo que a maior parte desses danos ocorrem em consequência do balanço energético positivo que leva ao aumento da gordura corporal e consequentemente, excesso de peso e obesidade. Uma das hipóteses mais conhecidas é o fato do consumo demasiado de nutrientes durante condições de sobrepeso e obesidade desencadear um processo inflamatório crônico de baixo grau, prejudicando e dificultando a homeostase metabólica (DEBNATH et al., 2016).

Assim, tem-se que o acúmulo de tecido adiposo branco induz o aumento na secreção de citocinas (adipocinas) com efeito sistêmico, neuroendócrino e autócrino/parácrino, as quais desencadeiam um quadro metainflamatório causando grande impacto em diversas funções corporais. Dentre elas incluem-se o sistema imune, sensibilidade à insulina, pressão arterial, metabolismo lipídico e homeostase corporal; situações estas que estão fortemente correlacionadas com as DCNT (APOVIAN e GOKCE, 2012; PRADO et al., 2009). Além disso, a excessiva deposição de gordura na célula adiposa em condições de grande oferta de alimentos pode provocar hipóxia, o que geralmente acarreta em morte celular e aumento da migração de macrófagos, os quais também irão secretar citocinas pró-inflamatórias sistemicamente, e consequentemente agravar o quadro inflamatório (JOHNSON et al., 2012). Dessa forma, o acúmulo de tecido adiposo devido ao excesso de triglicérides provindos da dieta, é um dos fatores responsáveis por promover alterações metabólicas que tornam o indivíduo mais suscetível a adquirir as DCNT.

Embora tanto o sobrepeso como a obesidade sejam as principais consequências do consumo de alimentos com alta densidade energética, estudos pré-clínicos têm focado também em possíveis danos ao sistema nervoso central (SNC) decorrentes de alterações metabólicas. Como já mencionado, o consumo alimentar excessivo acaba desestabilizando funções de diversos órgãos possivelmente por um processo inflamatório que tem início na periferia e que por sua vez é capaz de causar danos diretos as estruturas neurais (MILANSKI et al., 2009).



Além do desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, as dietas que incluem quantidades elevadas de lipídeos e carboidratos causam ao SNC aumento do estresse oxidativo (DE FARIAS et al., 2012), dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (AL-AUBAIDY e JELINEK, 2011), diminuição na expressão de genes mitocondriais (CROWE et al., 2008), fornecendo menos energia para as células neurais realizarem suas funções (RITOV et al., 2004).

Com isso, têm-se intensificado a busca por novas estratégias, tanto farmacológicas como não-farmacológicas, com poucos efeitos colaterais e alta efetividade, capazes de tratar os danos ocasionados por alterações na homeostase metabólica ou amenizar os seus efeitos deletérios no organismo. Porém, é importante que o estudo e desenvolvimento de novas terapias considerem a influência do estilo de vida, fatores sociais, hedônicos e psicológicos os quais limitam a efetividade das intervenções terapêuticas (RODGERS et al., 2012).

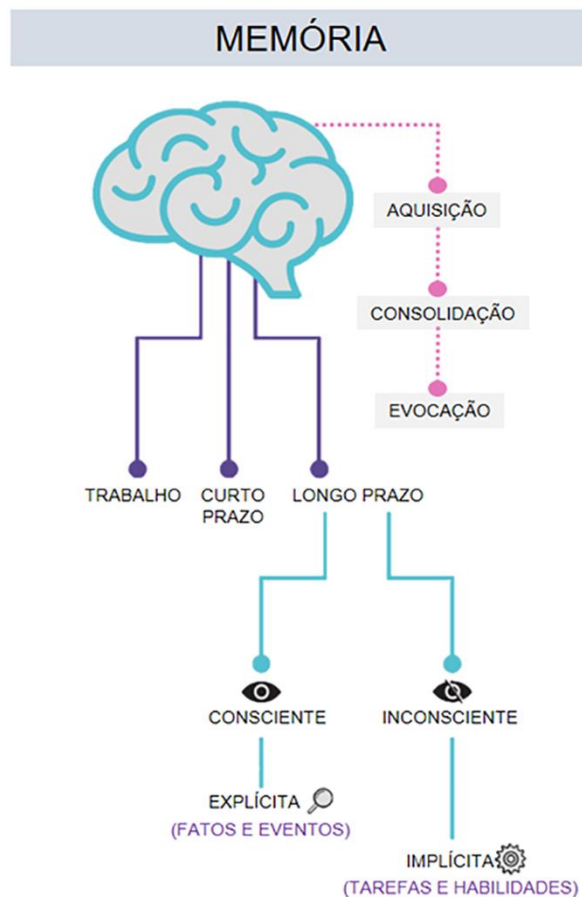
## 1.2 MEMÓRIA: DEFINIÇÕES GERAIS

O aprendizado é a aquisição de novos conhecimentos enquanto que a memória é o processo pelo qual esses conhecimentos são codificados, armazenados e posteriormente evocados (BEAR, M. et al., 2020). Todas as memórias são adquiridas através da percepção de novos estímulos ao longo da vida. Existem diferentes tipos de memória, que podem ser classificadas pela forma como são adquiridas: memória explícita ou implícita, e pelo tempo que são armazenadas: memória de trabalho, de curta ou longa duração (Figura 1).

As memórias explícitas ou declarativas são aquelas que armazenam fatos, como acontecimentos históricos e conversas cotidianas; enquanto que a implícita ou não-declarativa é a que adquirimos de forma inconsciente como tarefas e habilidades (andar de bicicleta e dirigir) (IZQUIERDO, I. A. et al., 2013). Quanto ao critério temporal, a memória de trabalho é um armazenamento temporário de informações com tempo de duração extremamente curto (segundos), porém é fundamental tanto no momento da aquisição como no momento da evocação de toda e qualquer outra memória. As memórias que persistem além de segundos denominam-se memórias de curta e longa duração; a primeira dura de minutos a horas e utiliza processos bioquímicos breves na região do hipocampo amígdala, e córtex entorrinal. Já a memória de longa duração perdura horas, dias ou anos e sua formação requer uma sequência de passos moleculares que duram aproximadamente de 3 a 6 horas no hipocampo, nos núcleos amigdalinos, e em outras áreas que são suscetíveis a numerosas influências (IZQUIERDO, I. A. et al., 2013; IZQUIERDO, L. A. et al., 2002; SQUIRE et al., 2015).

Ainda, formação de uma memória compreende uma sequência de três processos: aquisição, consolidação e evocação. Durante a aquisição (de segundos a poucos minutos), ocorre o processo de aprendizado inicial em que as informações permanecem na memória de trabalho. A consolidação é o processo pelo qual uma informação adquirida é estabilizada para ser armazenada como memória de longa duração. A evocação ocorre após a memória ser consolidada, sendo um processo que permite a lembrança e o uso de informações retidas (Figura 1) (IZQUIERDO, L. A. et al., 2002; KANDEL et al., 2000).

Figura 1: Classificação dos principais tipos de memória.



Fonte: Adaptado de *Saiba como são formadas as memórias e como melhorar as funções cognitivas*.

A capacidade de adquirir, armazenar e evocar informações é inerente a muitas áreas ou subsistemas cerebrais e não é função exclusiva de nenhuma delas. Assim, de forma isolada nenhuma estrutura cerebral ou mecanismo celular é capaz de explicar totalmente como ocorrem o processo de formação da memória (BEAR, M. F. et al., 2007). No entanto, os mecanismos que selecionam as informações que serão eventualmente armazenadas também são diversos, e

envolvem processos principalmente na região do hipocampo. Esta é uma região cerebral que possui uma capacidade impressionante de reorganização estrutural permanecendo estruturalmente plástica ao longo da vida (LEUNER e GOULD, 2010). Além disso, o hipocampo possui um circuito funcional que representa o sistema hipocampal no qual elementos como o giro dentado, CA1 e o CA3 são capazes de evidenciar plasticidade (IZQUIERDO, IVAN e MEDINA, 1997). A neuroplasticidade cerebral é fundamental para a aprendizagem, memória e cognição no geral; assim, o hipocampo é uma estrutura crítica para a formação de certos tipos de memória como a de curto e longo prazo, bem como na modulação da memória e aprendizagem espacial (IZQUIERDO, IVÁN et al., 1998).

Uma desregulação em qualquer parte do processamento molecular pode contribuir para a diminuição da memória associada a perturbações do desenvolvimento neurológico, cognitivo e neurodegenerativo (SAAB e MANSUY, 2014). Nesse sentido, o consumo excessivo de alimentos ricos em gorduras saturadas produz uma série de alterações neurofisiológicas capazes de impactar direta ou indiretamente o hipocampo (STRANAHAN et al., 2011), alterando suas funções cognitivas (KANOSKI, SCOTT E. e DAVIDSON, 2011). Dietas hipercalóricas afetam as memórias dependentes do hipocampo e de regiões circundantes ao córtex cerebral, como a memória de reconhecimento e a memória espacial em animais (NYARADI et al., 2014; PETROV et al., 2015). Ainda, o hipocampo também participa do controle de alimentação sendo altamente propenso a efeitos nocivos causados pelo consumo de alimentos ricos em ácidos graxos saturados e açúcares simples (DAVIDSON et al., 2012; KANOSKI, S. E. et al., 2010).

### 1.3 ALTERAÇÕES DIETÉTICAS E MEMÓRIA: EXPLORANDO OS MECANISMOS DE AÇÃO ENVOLVIDOS

Uma vez que a formação da memória é um processo complexo que envolve inúmeros eventos bioquímicos, neuroquímicos e moleculares em regiões específicas do cérebro (IZQUIERDO, A. et al., 2017; IZQUIERDO, IVAN e MEDINA, 1997), busca-se esclarecer os mecanismos de ação envolvidos nos danos cognitivos induzidos por modelos de exposição a dietas modificadas. Para este fim, utilizam-se modificações dietéticas com o intuito de reproduzir o comportamento nutricional humano, em modelos de experimentação animal para o estudo das consequências do consumo excessivo de gorduras e/ou carboidratos no SNC (ROSINI et al., 2012; WHITE et al., 2013).

Existem diferentes tipos de dietas que são atualmente usadas como agentes indutores de alterações metabólicas e centrais em animais, sendo as principais: hipercalóricas, hiperlipídicas e hiperglicídicas (MATIAS et al., 2018). As dietas hipercalóricas são baseadas nas dietas de cafeteria e caracterizam-se por proporcionar um valor energético superior às necessidades do animal, ou seja, são aquelas com nível calórico maior que a dieta padrão. Além disso, as dietas hipercalóricas podem apresentar alterações tanto na composição de lipídeos como de carboidratos ou de ambos. Enquanto as dietas hiperlipídicas e hiperglicídicas são aquelas que apresentam uma maior quantidade de lipídeos e carboidratos, respectivamente, em comparação com uma dieta padrão (CARVALHO et al., 2013; MATIAS et al., 2018). Embora muitos estudos demonstrados na literatura optem pelo uso de modelos com alteração em apenas um dos macronutrientes (GAINNEY et al., 2016; YOSHIZAKI et al., 2020; ZHAO, B. et al., 2020), outros modelos têm mostrado os efeitos da combinação dessas dietas (KERR et al., 2021; VELOSO et al., 2021)

A partir dos estudos pré-clínicos é possível observar a existência de uma relação entre o consumo excessivo de alimentos com alta densidade energética e a ocorrência de danos cognitivos (ESKELINEN et al., 2008; WHITMER et al., 2005). Na maior parte dessas pesquisas os resultados indicaram que a ingestão de uma dieta rica em gorduras e/ou carboidratos causaram déficits de memória e aprendizagem em roedores (KACZMARCZYK et al., 2013; ZHAO, B. et al., 2020). Tanto as memórias de curta e longa duração, bem como a aprendizagem e memória espacial são suscetíveis a danos proporcionados pela ingestão de dietas lipídicas e/ou ricas em carboidratos (frutose) em animais (KANG et al., 2016; LIU, Z. et al., 2017; WALKER et al., 2014). Ainda, os maus hábitos alimentares durante a infância e adolescência são um dos fatores causais do declínio cognitivo na vida adulta (HSU et al., 2015).

### **1.3.1 Regulação redox: estresse oxidativo e a via de sinalização Keap1/Nrf2**

Dietas com baixa qualidade nutricional são consideradas um dos fatores exógenos capazes de modular negativamente o estresse oxidativo (BARBOSA, K. B. F. et al., 2010). Estudos pré-clínicos de exposição a dietas ricas em lipídeos e/ou carboidratos mostram que o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos envolvidos em danos teciduais e na contribuição para o desenvolvimento de doenças metabólicas em roedores (DAVERI et al., 2018; TIAN et al., 2021). O acúmulo de lipídeos e carboidratos provindos da alimentação levam ao aumento do metabolismo celular assim como da cadeia transportadora de elétrons; por isso a elevada ingestão de dietas hipercalóricas têm sido associada ao aumento da produção de

espécies reativas, promovendo tanto o estresse oxidativo como o nitrosativo (SILVA, W. J. M. D. e FERRARI, 2011).

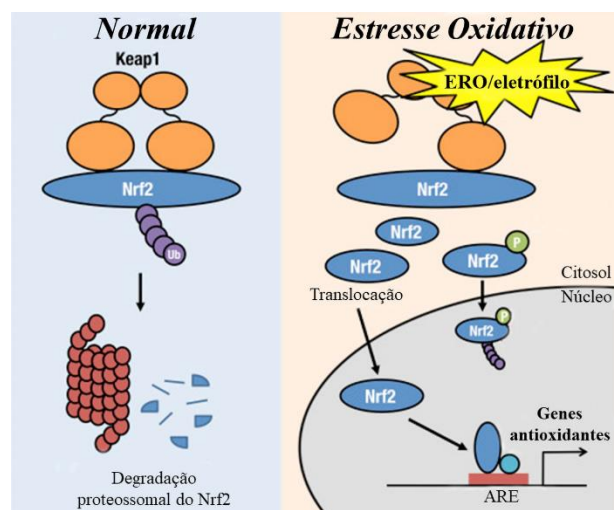
O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a produção e o acúmulo de espécies reativas e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante em neutralizar esses produtos reativos em células e tecidos (CIOFFI et al., 2019). As espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) são átomos ou moléculas que apresentam um ou mais elétrons não-pareados: oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) e radical semiquinona ( $\text{Q}^\cdot$ ) (GUTTERIDGE e HALLIWELL, 2010). Em condições normais, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações dos processos metabólicos no organismo; no entanto, a produção excessiva pode conduzir aos danos oxidativos (BARBOSA, K. B. F. et al., 2010). Frequentemente o estresse oxidativo é descrito como um fenômeno de auto propagação, pois quando há liberação excessiva de EROs desencadeado por danos celulares, as próprias macromoléculas danificadas podem se comportar como e/ou se tornar uma espécie reativa (SALIM, 2017).

O estresse oxidativo pode resultar em danos nas membranas celulares, assim como no DNA de diversas células e organelas causando à diminuição de sua função e à exacerbação de processos patológicos (REN et al., 2010). Sendo que o cérebro é altamente vulnerável a insultos oxidativos excessivos devido ao seu rico conteúdo de lipídios, alta demanda de energia, alto consumo de oxigênio (20% do oxigênio basal) e baixa capacidade antioxidante quando comparado com os outros tecidos (MURIACH et al., 2014). A formação de EROs desempenha um papel importante no dano da função cognitiva (BEILHARZ, J. et al., 2015), uma vez que o desequilíbrio redox prejudica a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (HUANG et al., 2015). Particularmente, em células neuronais o estresse oxidativo causa alterações nos mecanismos intracelulares, dano à membrana celular e mitocondrial, apoptose e autofagia; essas alterações estão relacionadas com a progressão e desenvolvimento de doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer e danos cognitivos (KIM, H. J. et al., 2020; LI et al., 2008).

Como as EROs são continuamente formadas em pequenas quantidades pelos processos normais do metabolismo, todas as células possuem mecanismos para mitigar seus efeitos agressores: as defesas antioxidantes. Uma importante resposta biológica ao estresse oxidativo é a ativação do sistema Proteína 1 associada à ECH tipo Kelch (Keap1)/Fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2 (Nrf2); uma via de sinalização responsável pela regulação de genes

citoprotetores em resposta ao aumento de espécies reativas (KANSANEN et al., 2012). Em condições normais, no citoplasma a Keap1 regula negativamente a via, impedindo a translocação nuclear do Nrf2 além de promover a degradação proteossomal por ubiquitinação dessa proteína (GAN e JOHNSON, 2014). Quando as células são expostas ao estresse oxidativo ou eletrofilico, ocorre a ativação do sistema Keap1/Nrf2 devido a modificação de resíduos de cisteína da Keap1 a qual perde sua capacidade de direcionar o Nrf2 a degradação; assim, há a translocação do Nrf2 para o núcleo, formação de um complexo com o elemento de resposta antioxidante (ERA) e indução da expressão de genes-alvo (KANSANEN et al., 2012) (Figura 2).

Figura 2. Via de sinalização Keap1/Nrf2 em condições normais e de estresse oxidativo. Na condição normal, Keap1 impede a translocação do Nrf2, contribuindo para sua degradação proteossomal. Durante situações de estresse oxidativo, ocorre a liberação da Keap1 do Nrf2 o qual é fosforilado e translocado para o núcleo para manter a homeostase redox. No núcleo, Nrf2 interage com o elemento de resposta antioxidante induzindo a expressão de genes antioxidantes.



Fonte: Adaptado de SUZUKI et al. (2016). *Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer.*

O Nrf2 nuclear ativa a expressão de citoprotetores, incluindo genes de enzimas antioxidantes e detoxificadoras (CHORLEY et al., 2012) os quais preservam a homeostase redox e eliminam substâncias tóxicas antes que possam causar danos as células (SHA et al., 2019). A heme oxigenase-1 (HO-1), superóxido dismutase e glutatona peroxidase são exemplos de enzimas antioxidantes que atuam por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou neutralizando a formação de EROs (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). Enquanto que as enzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo NADPH desidrogenase quinona

1, glutationa-redutase e glutationa-S-transferase agem como agentes detoxificadores (HUBER et al., 2008).

### 1.3.2 Inflamação

A inflamação é uma resposta do sistema imunológico que possui como objetivo a proteção do organismo na presença de uma infecção, dano ou estresse celular. É um mecanismo fisiopatológico natural de defesa que envolve o recrutamento de vários tipos de células e moléculas de sinalização, produzindo respostas locais e sistêmicas (RAMOS-NINO, 2013). Em situações não controladas, o processo inflamatório pode evoluir para uma inflamação crônica de baixo grau, a qual pode levar a danos teciduais na tentativa de proteger o organismo contra estímulos nocivos (WÄRNBERG et al., 2009).

A inflamação periférica inicia uma cascata de eventos com a liberação de substâncias imunoativas pelos macrófagos, como as citocinas pró-inflamatórias que podem resultar em neuroinflamação. O termo neuroinflamação é empregado para descrever o conjunto de respostas imunológicas que ocorrem no SNC, e é caracterizada pela ativação das células gliais, como astrócitos e micróglia (OBERHEIM et al., 2012). Essas células são mais quiescentes em comparação com macrófagos de outros tecidos, mas respondem aos estímulos inflamatórios produzindo mais moléculas pró-inflamatórias como a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6, (IL-6) o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2); uma enzima importante para síntese de prostaglandinas (MACHADO et al., 2020; SHASTRI et al., 2013).

A micróglia é o primeiro tipo celular a responder em situações nocivas ao SNC, sendo assim conhecida como um macrófago especializado. Embora possuam função importante na neuroproteção (VINET et al., 2012) e neurogênese (SIERRA et al., 2010), a principal função desta célula é a resposta imune liberando as citocinas pró-inflamatórias e o TNF- $\alpha$  (SHASTRI et al., 2013). Os astrócitos são células do SNC que funcionam na promoção da sobrevivência e maturação neuronal (CHRISTOPHERSON et al., 2005) e que participam de todas as funções essenciais do SNC, como metabolismo energético, defesa imunológica e neurotransmissão (OBERHEIM et al., 2012). Na presença de agentes nocivos ocorre a alteração das proteínas de citoesqueleto como a proteína fibrilar ácida (GFAP), a qual tem um aumento em sua expressão durante situações de injúria (PEKNY e PEKNA, 2004).

Outros mecanismos importantes relacionados com a inflamação, é a ativação de vias que modulam a produção tanto de citocinas pró- como anti-inflamatórias. Como por exemplo,

a ativação da via do factor nuclear kappa  $\beta$  (NF $\kappa$  $\beta$  p65) e das proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPKs) são vias envolvidas na modulação de respostas inflamatórias. As MAPKs abrangem um grande número de proteínas, incluindo a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), a quinase c-Jun N-terminal (JNK) e a proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38) (SILVA, B. V. et al., 2009). É descrito que a ativação dessas vias através de mecanismos de fosforilação induz um aumento na transcrição de mediadores inflamatórios, agravando ainda mais o quadro inflamatório. Nesse sentido, a presença excessiva e crônica de fatores pró-inflamatórios perturba o sistema neuroendócrino e a neurotransmissão, prejudicando a função sináptica e causando morte neuronal; tais fatores culminam no desenvolvimento de várias doenças neurológicas, incluindo danos cognitivos, desordens de humor e transtornos de ansiedade (KOISTINAHO et al., 2011; YAFFE, 2004).

Alguns dados da literatura indicam que a inflamação crônica pode ser regulada pela alimentação, pois há uma associação entre uma maior concentração de marcadores inflamatórios e padrões alimentares ricos em ultraprocessados. A exposição a uma dieta contendo 60% de gordura aumenta a expressão dos genes das citocinas IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$ , bem como induz um aumento da fosforilação das proteínas p38 MAPK e NF $\kappa$  $\beta$  p65 em fígado e no tecido adiposo de camundongos (XU et al., 2021). Outro estudo recente, associou alterações nos níveis do NF $\kappa$  $\beta$  p65 e das JNK e p38 MAPKs causados por uma dieta rica em gordura (60%) com o desenvolvimento de um processo inflamatório em fígado de camundongos C57BL/6J (TAO et al., 2020).

Ademais, dietas com alterações nos macronutrientes também induzem inflamação no SNC, pois relatos demonstram que danos cognitivos estão relacionados com alterações da via das MAPKs em hipocampo de ratos expostos a uma dieta contendo gordura e colesterol durante seis semanas (ABD AL HALEEM e EL-BAKLY, 2019). Um processo neuroinflamatório também é observado pelo aumento da expressão das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e do TNF- $\alpha$  e dos marcadores de micróglia (Iba-1: molécula adaptadora de cálcio inoxidado-1) e de astrócito (GFAP) em hipotálamo de camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura (PANG et al., 2020). Contudo, uma dieta ocidental é considerada uma dieta predominantemente pró-inflamatória, contribuindo para o aumento de doenças crônicas (DCNTs) e alterações nas funções cognitivas (CHRIST et al., 2019; MANZEL et al., 2013; WÄRNBERG et al., 2009). Porém, ainda não está totalmente esclarecido se danos ao SNC ocorrem devido a ativação direta de proteínas inflamatórias no SNC ou se o quadro inflamatório é originado primeiramente na periferia e após no cérebro.

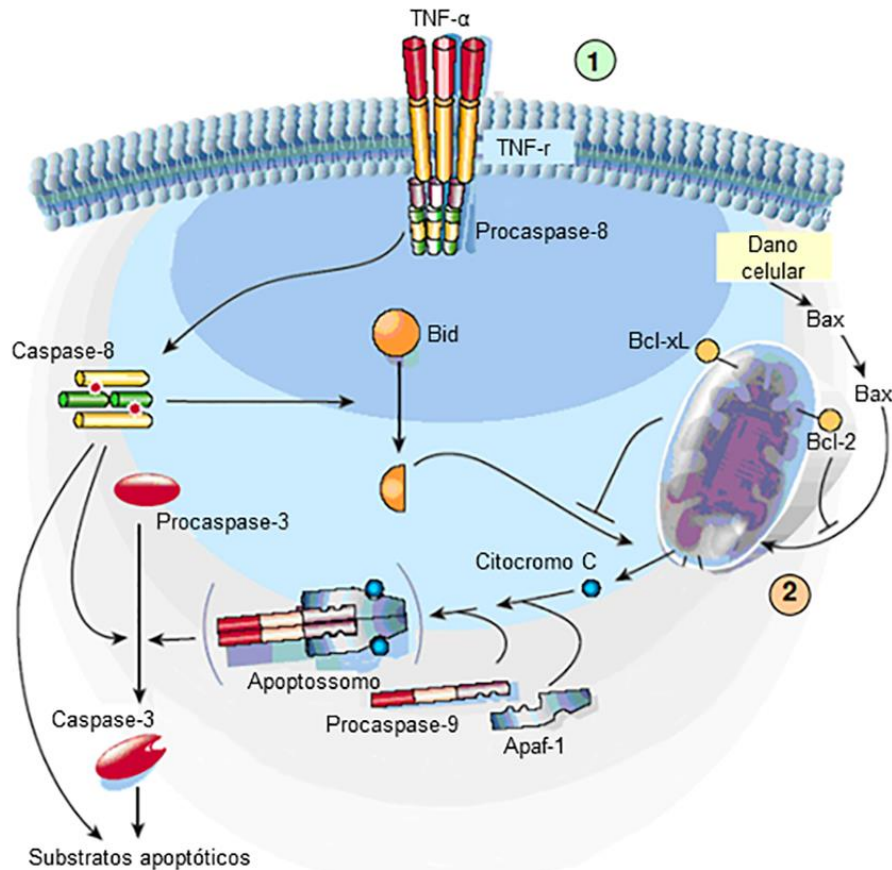


### 1.3.3 Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular programado e altamente controlado; um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para a homeostase tecidual e em certas condições patológicas. De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas; a célula sofre alterações morfológicas como por exemplo a fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos que serão eliminados por fagocitose (ANAZETTI e MELO, 2007; GRIVICICH et al., 2007)

A ativação do processo de apoptose pode ser iniciada por duas diferentes vias: a via intrínseca (mitocondrial) ou a via extrínseca (citoplasmática), e ambas essas vias culminam na ativação de proteases conhecidas como caspases efetoras que realizam a clivagem proteolítica (Figura 3) (GRIVICICH et al., 2007). Em suma, na via intrínseca ocorre a translocação de proteínas pró-apoptóticas da família das Bcl-2 do citosol para a mitocôndria com a consequente liberação do citocromo c para o citosol; este irá ligar-se à proteína reguladora da apoptose (Apaf-1) promovendo a ativação da caspase-9 e subsequentemente, a à ativação de caspases efetoras, como a caspase-3. Já a via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos (TNF- $\alpha$ ) a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral, ocasionando o recrutamento de proteínas adaptadoras que irão ativar diretamente a caspase-8; uma vez ativada, a caspase-8 pode processar e ativar outras caspases (caspase-3) levando à destruição celular (Figura 3) (BUDIHardjo et al., 1999; HENGARTNER, 2000; SPEIRS et al., 2011). Ademais, a ativação das caspases executoras (caspase-3) levam ao aumento da clivagem da Poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP), uma proteína de reparo ao DNA, no qual a clivagem inibe sua capacidade de reparo com consequente morte celular por apoptose (POLLACK et al., 2002).

Figura 3. Vias de indução da apoptose. (1) A via extrínseca é desencadeada por membro da família de receptores de morte celular (TNF-R). Quando os ligantes específicos (ex. TNF- $\alpha$ ) se acoplam aos seus receptores ocorre ligação desse complexo a pró-caspase-8 resultando na ativação dessa enzima por clivagem proteolítica. A caspase-8 pode, diretamente ou via mitocondrial, ativar a caspase-3 (efetora). (2) A via intrínseca é ativada por sinais de estresse celular que resultem em disfunção mitocondrial. Ocorre a ativação da Bax e Bid que permitem a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol. No citosol o citocromo c associa-se a Apaf-1 e pró-caspase-9, formando o apoptossomo que por sua vez ativará a caspase-3. Ambas as vias levam a formação de substratos específicos que levam a morte celular por apoptose.



Fonte: Adaptado de HENGARTNER (2000). *The biochemistry of apoptosis*. *Nature*.

Dentre os mecanismos desencadeadores de apoptose, a JNK e p38 MAPKs são exemplos de proteínas que estão envolvidas na regulação transcricional e pós-transcricional das proteínas da apoptose (YUE e LÓPEZ, 2020). A ativação tanto da JNK como da p38 MAPK promovem apoptose através do aumento da expressão das proteínas pró-apoptóticas e diminuição da expressão daquelas anti-apoptóticas (CUENDA e ROUSSEAU, 2007; DHANASEKARAN e REDDY, 2008). A JNK quando ativa por fosforilação pode antagonizar a atividade anti-apoptótica da Bcl-2 e Bcl-XL diretamente ou via ativação das proteínas promotoras de morte associado ao Bcl-2 (Bad) e proteína 11 semelhante ao Bcl2 (Bim). Isto possibilita a ativação da proteína X associada ao Bcl-2 (Bax), uma proteína pró-apoptótica que interage com canais de ânions dependentes de voltagem induzindo sua abertura com consequente perda do potencial da membrana mitocondrial e liberação do citocromo C (DHANASEKARAN e REDDY, 2008).

O equilíbrio entre a ativação de proteínas pró- e anti-apoptóticas desempenha um papel fundamental na neurodegeneração, pois prejudica a sobrevivência e o funcionamento neuronal normal (GHAVAMI et al., 2014; UPADHYAY et al., 2003). Um exemplo é a doença de

Alzheimer em que os neurônios entram em processo de morte celular por apoptose precocemente, resultando em demência progressiva, perda da cognição e da memória (JIMÉNEZ DEL RIO e VÉLEZ PARDO, 2001). Um estudo recente demonstrou que ratos com déficits de memória apresentaram alterações histológicas e bioquímicas em proteínas relacionadas a cascata da apoptose na região hipocampal (HADIZADEH-BAZAZ et al., 2021). A ativação da caspase-3 e a fragmentação de DNA, resultante de cascatas de sinalização apoptóticas são observados em neurônios e células gliais de ratos com danos de memória e aprendizagem (YANG et al., 2021). Em um outro estudo a ativação da apoptose hipocampal juntamente com o desenvolvimento de danos cognitivos são consequência do consumo de uma dieta rica em gordura (60%) em camundongos (ZHUANG et al., 2019). Além disso, estudos pré-clínicos evidenciaram que o consumo de dietas ricas em ácidos graxos saturados leva a ativação da apoptose pelo aumento dos níveis de caspase-3 e Bax e diminuição da Bcl-2 em neurônios hipotalâmicos de camundongos (PANG et al., 2020); essas alterações podem promover ainda mais o dano celular desencadeado pelo consumo desses nutrientes. Nesse sentido, é possível que a modulação dos mecanismos envolvidos nos processos apoptóticos estejam associados com a melhora da função cognitiva de animais.

#### 1.4 BENEFÍCIOS DO EXERCÍCIO COMO UMA TERAPIA NÃO-FARMACOLÓGICA

O novo padrão de estilo de vida da sociedade moderna resultou em um ambiente propício para o sedentarismo, juntamente com alimentação excessiva de alimentos hipercalóricos. Assim, contribuindo para o aumento do sedentarismo e seus malefícios associados à saúde e ao bem-estar do indivíduo (GUALANO e TINUCCI, 2011). Estratégias para controlar e/ou prevenir danos induzidos pelo consumo excessivo de alimentos hipercalóricos é uma tarefa que necessita cuidado especial, tendo suma importância a prática de exercícios físicos como um estilo de vida saudável (KOVESDY et al., 2017). A associação de exercício e dietas saudáveis promovem benefícios tanto físicos como mentais, sendo considerado um tratamento auxiliar para diversas doenças (JORGE FONSECA-JUNIOR et al., 2013).

Como definição geral, tem-se que o exercício físico é toda atividade física planejada, estruturada e repetitiva que tem por objetivo a melhoria da qualidade de vida e aptidão física bem como a manutenção da saúde física e mental (DINOFF et al., 2018; MATSUDO et al., 2001). Dessa forma, o exercício físico tem sido associado como fator de proteção para a saúde

desde a década de 1950 (SHIROMA e LEE, 2010) devido aos seus benefícios relacionados à redução de doenças crônicas (COTMAN et al., 2007; HARATI et al., 2010), à diminuição do peso corporal em adultos praticantes de atividade aeróbica regular (DONNELLY et al., 2009) ou ainda à diminuição do risco de morte prematura por doenças cardiovasculares (ZHAO et al., 2014) e capacidade de promover neuroproteção e neuroplasticidade (HAYES et al., 2008; ROJAS VEGA et al., 2006).

Terapias não-farmacológicas têm despertado a atenção de pesquisadores durante as últimas décadas; o exercício físico é uma das terapias não-farmacológicas mais importantes e acessíveis de proteção a função cerebral (ANTUNES et al., 2006). O exercício físico regular desempenha um importante papel no metabolismo energético, promovendo uma série de eventos fisiológicos e bioquímicos que levam à manutenção da saúde (LJUBICIC et al., 2010). Dessa forma, acredita-se que os efeitos do exercício físico regular estão associados com a melhora da função cognitiva em modelos animais de doenças neurodegenerativas (HOTTING e RODER, 2013; KRAMER et al., 2006), bem como na prevenção da neuroinflamação e estresse oxidativo (YI et al., 2012) promovendo uma melhora nos danos de aprendizagem e memória induzidos por uma dieta hipercalórica (MOLTENI et al., 2004).

É importante ressaltar que as respostas fisiológicas associadas ao exercício físico dependem do protocolo de treinamento utilizado, que pode variar de acordo com o tipo de motivação (forçado ou voluntário), com a intensidade do esforço (leve, moderado ou intenso), com a duração (tempo por sessão) e com a frequência com que é realizado (por exemplo, diário, três vezes por semana, etc) (NARATH et al., 2001). Tanto o exercício voluntário quanto o forçado têm sido utilizados para investigar os efeitos da atividade física sobre a função cerebral; no entanto, tem-se argumentado que o exercício forçado é mais consistente, uma vez que todos os animais são submetidos às mesmas condições experimentais (MORASKA et al., 2000)

Exercício é um importante regulador do estresse oxidativo. Sabe-se que uma única sessão de exercício intenso e exaustivo pode aumentar a formação de EROs, levando ao dano oxidativo dos componentes celulares; no entanto, o exercício regular eleva a produção de ROS a um nível que pode induzir danos toleráveis, uma vez que podem induzir adaptações benéficas ao regular positivamente os sistemas antioxidantes celulares e estimular os sistemas de reparo de danos oxidativos (GOMES, MARIANA JANINI et al., 2017; RADÁK et al., 1999). Para proteger os tecidos contra os danos causados pelas EROs, as enzimas antioxidantes como SOD, CAT e GPX/GR parecem responder de maneira adaptativa, elevando suas atividades em tecidos

e órgãos de indivíduos treinados (JENKINS; GOLDFARB, 1993; REDDY AVULA; FERNANDES, 1999).

Exercícios aeróbicos de intensidade baixa à moderada são descritos como capazes de reduzir a concentração de biomarcadores de estresse oxidativo e modular positivamente enzimas antioxidantes (GOMES, MARIANA J. et al., 2020). Um dos exercícios aeróbicos utilizado em estudos pré-clínicos é a natação, visto que roedores possuem habilidade natural de nadar e que nesse modelo podem ocorrer adaptações ao treinamento físico semelhantes às observadas em seres humanos (VOLTARELLI et al., 2002). O exercício de natação exerce influência sobre o balanço entre ataque oxidativo e os mecanismos de defesa antioxidante reduzindo a produção de espécies oxidantes e aumentando a resistência de órgãos e tecidos contra a ação dos radicais livres (POLIDORI et al., 2000). Ainda, estudos relatam que o exercício de natação de intensidade moderada promove adaptações antioxidantes através do aumento da atividade de enzimas antioxidantes em hipocampo de ratas (STONE et al., 2014).

Além da propriedade antioxidante, estudos demonstram que o exercício de natação é efetivo em promover a recuperação da função cognitiva em animais expostos a uma dieta rica em lipídeos (21%) (WANG, X. et al., 2020b). Ademais, o exercício de natação previne contra o desenvolvimento de dano cognitivo e a deposição de peptídeos beta-amiloides em animais alimentados com uma dieta rica em gordura (60%) (MAESAKO et al., 2012). Embora a literatura seja vasta neste sentido, faltam ainda estudos que esclareçam o efeito do exercício de natação durante os períodos iniciais de vida em roedores expostos a uma dieta enriquecida com gordura e carboidrato.

## 1.5 SELÊNIO: UM MICRONUTRIENTE ESSENCIAL AO ORGANISMO

O selênio é um micronutriente essencial obtido através da alimentação e apresenta efeitos benéficos ao organismo que perduram por muito tempo, pois é importante na manutenção de funções biológicas em organismos vivos (Figura 4) (FLOHE et al., 1973; ROTRUCK et al., 1973). O papel fisiológico do selênio no organismo deve-se principalmente à sua presença em 25 diferentes tipos de selenoproteínas (selenocisteínas) em humanos (TINGGI, 2008). Uma das propriedades descritas do selênio é a ação antioxidante, que é realizada por enzimas como, por exemplo, a glutathiona peroxidase e a tioredoxina redutase. Essas são conhecidas como selenoenzimas, tendo importância na proteção contra peroxidação lipídica, danos celulares oxidativos e manutenção do status oxidativo (BARBOSA, N. V. et al.,

2017; TINGGI, 2008). Como níveis normais de selênio podem restaurar a homeostase redox, é essencial para ativação e funcionamento do sistema imune, uma vez que o aumento na produção de EROs afeta diretamente células hospedeiras responsáveis pela função imune (GOSTNER et al., 2013).

Além do estresse oxidativo, a modulação da via das MAPKs está envolvida na regulação do sistema imune por níveis adequados de selênio (ZHANG, L. et al., 2020). Por isso, os efeitos do selênio abrangem também vias inflamatórias como das MAPKs e NF $\kappa$ B, que em processos de inflamação crônica auxiliam na normalização dos níveis de proteínas pró- e anti-inflamatórias (QAMAR et al., 2021; WANG, Y.-S. et al., 2020c). Outra função importante relacionada aos níveis de selênio, é a proteção contra toxicidade celular através de mecanismos de morte celular; o selênio é capaz de aumentar a expressão de proteínas anti-apoptóticas, e diminuir as pró-apoptóticas em animais (KAUR et al., 2021).

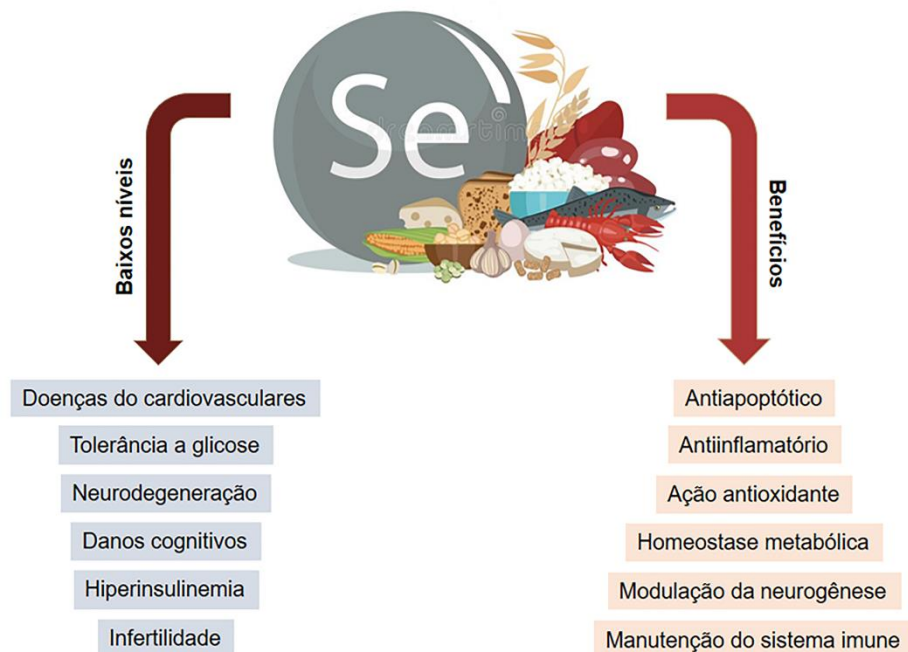
Levando-se em conta as propriedades benéficas do selênio, a deficiência desse micronutriente pode resultar no surgimento ou agravamento de inúmeras doenças. O selênio desempenha um papel fundamental nos efeitos biológicos de alguns vírus como a atual doença do coronavírus (COVID-19); isso pois, a deficiência de selênio parece aumentar a incidência da doença em pacientes de diferentes cidades (LIU, Q. et al., 2021). Ademais, a tolerância a glicose e hiperinsulinemia são características comuns entre o desenvolvimento de síndrome metabólica e da redução hepática dos níveis de selênio (SEALE et al., 2012). As consequências da obesidade podem ser exacerbadas por uma alimentação inadequada de selênio ou por sua deficiência pois, interfere no metabolismo de gordura corporal (SOARES DE OLIVEIRA et al., 2021). Outras enfermidades como doenças cardiovasculares, câncer (TINGGI, 2008), fertilidade e reprodução (RAYMAN, 2012), a cirrose e a diabetes (WANG, XIN et al., 2016), entre outras também são afetadas por baixas concentrações de selênio no organismo humano.

O selênio é crucial para o cérebro. Durante períodos de depleção de selênio o cérebro é mantido através do selênio provindo de outros tecidos, enquanto que na deficiência desse nutriente pode ocorrer lesão cerebral irreversível (BURK e HILL, 2009). Concentrações baixas de selênio no SNC são responsáveis por causar perda neuronal e alterações metabólicas resultando no desenvolvimento de danos cognitivos e até agravamento de doenças neurodegenerativas (SCHWEIZER et al., 2004). Tais efeitos podem ser devido a importância do selênio na manutenção do estado redox e ação anti-inflamatória, além de melhorar a dinâmica mitocondrial, participar na regulação dos canais de Ca<sup>2+</sup> e na modulação da neurogênese no SNC (PAPP et al., 2007). Ainda, um estudo recente demonstra que o selênio

reverte danos cognitivos induzidos pela exposição a uma dieta rica em gordura e colesterol; esse efeito é observado pelo aumento dos níveis de proteínas importantes para neuroproteção; o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP (CREB), através da modulação da via das MAPKs em hipocampo de ratos (ABD AL HALEEM e EL-BAKLY, 2019)

Apesar da necessidade da ingestão de selênio, sabe-se que os limites entre níveis essenciais e tóxicos podem ser estreitos, no Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determina que a ingestão diária recomendada desse micronutriente é de 34 µg para adultos. Contudo, uma ingestão de níveis adequados de selênio obtida tanto dos alimentos fonte: castanha-do-Pará, cebola, alho, brócolis, cogumelos, cereais, pescados, ovos e carnes (DUMONT et al., 2006) quanto de suplementos medicamentosos, possivelmente podem ser usados para prevenir e/ou para amenizar o desenvolvimento danos ao organismo (Figura 4).

Figura 4: Benefícios da ingestão do micronutriente selênio, bem como os danos relacionados seus aos níveis baixos no organismo.



Fonte: o próprio autor, 2021. Se - Selênio.

### 1.5.1 Compostos orgânicos de selênio: Disseleneto de *m*-trifluormetil difenila

Na natureza, o selênio encontra-se nas formas orgânicas (selenocisteína, selenocistina e selenometionina) e inorgânicas (selenito e selenato), sendo que as formas orgânicas apresentam menor toxicidade e maior biodisponibilidade (NOGUEIRA e ROCHA, 2011). A bioquímica e farmacologia de compostos contendo selênio em sua estrutura são alvo de interesse científico, uma vez que o avanço na área de síntese e reatividade tem desenvolvido compostos orgânicos de selênio estáveis, que apresentam potencial terapêutico para tratar diferentes doenças (NARAJI et al., 2007).

Entre as moléculas orgânicas de selênio, o protótipo da classe disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> (Figura 5A) apresenta uma diversidade de ações farmacológicas como efeito do tipo antidepressivo (QUINES et al., 2016) e ansiolítico (ROSA et al., 2016), atividade anti-inflamatória (LUCHESE et al., 2012; WANG, X. et al., 2021), antioxidante (MÜLLER et al., 2018), hepatoprotetora (BORGES et al., 2008; FULCO et al., 2020), antiviral (SARTORI et al., 2016), antinociceptivo (JARDIM et al., 2020; ROSA et al., 2015), neuroprotetor (LEITE et al., 2016), entre outras.

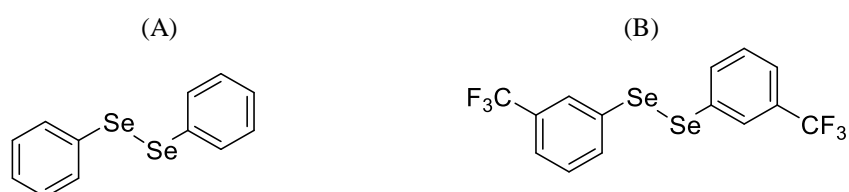
Além dessas propriedades, o fato do (PhSe)<sub>2</sub> e de seus análogos apresentarem efeitos positivo no desempenho cognitivo em roedores tem chamado atenção. A suplementação de (PhSe)<sub>2</sub> na dieta melhora os danos de memória e aprendizagem resultantes do envelhecimento em ratos, além de restaurar os níveis hipocâmpais de CREB, uma proteína relacionada com a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (CECHELLA et al., 2014). Outro dado interessante, é que a administração de (PhSe)<sub>2</sub> via oral em uma dose baixa (1 mg/kg), reverte danos em diferentes tipos de memória: espacial, curta e longa duração de maneira sexo-específica em camundongos (JARDIM et al., 2017). A exposição ao (PhSe)<sub>2</sub> através de uma dieta suplementada, melhora a performance de ratos no teste do labirinto aquático de Morris; teste preditivo para avaliação da memória espacial (DIAS et al., 2012)

O disseleneto *m*-trifluorometil difenila (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> (Figura 5B) é um derivado do (PhSe)<sub>2</sub>; para síntese do composto (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> foram realizadas pequenas mudanças na estrutura química, as quais podem modificar parcial ou completamente o efeito de uma droga. Neste caso, a inserção de átomos de flúor na estrutura é comumente utilizada na química farmacêutica para melhorar a estabilidade metabólica, e a biodisponibilidade de moléculas, uma vez que as tornam mais resistentes ao ataque oxidativo (PURSER et al., 2008). Ainda não existem estudos demonstrando a relação estrutura-atividade do composto (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>, mas a presença do grupamento trifluorometila (CF<sub>3</sub>) possivelmente contribua para seus efeitos farmacológicos duradouros e ampla distribuição (BRÜNING et al., 2014). A farmacocinética



do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> ainda é pouco conhecida; no entanto, um estudo realizado por BRÜNING et al. (2014) sugere um perfil de distribuição através da quantificação de selênio em diferentes tecidos, no qual altos níveis de selênio foram observados em diferentes tipos de tecidos, incluindo fígado, rins, pulmão, e encéfalo. Embora, os níveis de selênio quantificados possam ser derivados do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> não-biotransformado ou de seus metabólitos, este estudo demonstra que o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> apresenta uma ampla distribuição.

Figura 5. Estrutura química do disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> (A) e do disseleneto de *m*-trifluormetil difenila (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> (B)



Fonte: O próprio autor, 2021.

De acordo com os efeitos farmacológicos descritos até o momento, o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> é um composto promissor para a prevenção e tratamento de alguns danos ao organismo. As primeiras propriedades do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> demonstradas são, o efeito do tipo ansiolítico e a modulação do sistema serotoninérgico em camundongos (BRÜNING et al., 2009). Por conseguinte, observa-se que administração via oral de (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> possui ação antinociceptiva em diferentes modelos de indução de dor, bem como ação antidepressiva em testes do nado forçado em camundongos; tais efeitos envolvem a modulação tanto de receptores opioides como do sistema serotoninérgico em camundongos (BRÜNING et al., 2010; BRÜNING et al., 2011). Atualmente, outros estudos mostram que o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> (10 mg/kg, via oral) exerce efeito anti-inflamatório através da diminuição dos níveis de proteínas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e COX-2) no córtex contralateral de camundongos (ARAÚJO et al., 2020); uma administração de (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> (25 mg/kg, via oral) modula proteínas da via das MAPKs em córtex pré-frontal de camundongos com fenótipo depressivo (ROSA et al., 2018); o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> (10 mg/kg, via oral) diminui a ativação hipocampal de proteínas relacionadas a vias pró-apoptóticas em camundongos com fenótipo depressivo (MARTINS et al., 2020).

Sobre às propriedades toxicológicas o composto (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>, apresenta baixa toxicidade em camundongos em doses agudas, com DL50 (dose letal em 50% dos animais) de

278 mg/kg, assim como não apresenta alterações de parâmetros bioquímicos como a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST), a ureia e a creatinina em doses altas (SAVEGNAGO et al., 2009). Ressalta-se também, que após um tratamento repetido com o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>, nas doses de 5 a 50 mg/kg pela via intragástrica, durante oito dias em roedores, não se observou toxicidade sistêmica, evidenciando-se que o uso contínuo do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> seja relativamente seguro (ROSA et al., 2017). Ainda, em relação ao protótipo, o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> não apresenta efeito pró-convulsivante em altas doses, sugerindo que a inserção do grupamento CF<sub>3</sub> na molécula de (PhSe)<sub>2</sub> possa reduzir sua toxicidade (NOGUEIRA et al., 2003).

Outra característica importante é a lipofilicidade do composto (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>, sendo capaz de atravessar facilmente a barreira hemato-encefálica, aumentando os níveis de selênio no SNC e exercendo os seus efeitos farmacológicos, principalmente relacionados com os efeitos neuroprotetores. Contudo, levando-se em conta que modificações na estrutura e/ou a inserção de grupos funcionais no anel aromático de compostos orgânicos de selênio não apresentam alta toxicidade e melhoram as propriedades biológicas, torna-se relevante a expansão de estudos para esclarecer detalhadamente os mecanismos de ação envolvidos no potencial farmacológico do composto (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>.

## 2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL      Investigar os efeitos do exercício de natação e do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> frente a alterações na aprendizagem e memória de camundongos jovens expostos a uma dieta hipercalórica. Assim como elucidar os mecanismos de ação envolvidos nos possíveis efeitos neuroprotetores de ambas as terapias.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Em camundongos jovens alimentados com uma dieta hipercalórica e submetidos à **terapia não-farmacológica** determinar:
  - a. Se o exercício de natação tem efeito terapêutico sobre o dano de aprendizagem e memória de camundongos;
  - b. Se o exercício de natação modula a via de sinalização Nrf2/Keap1/OH-1, bem como o estresse oxidativo em hipocampo de camundongos;
  - c. Se os efeitos do exercício de natação envolvem a biogênese mitocondrial pela modulação dos níveis da mtTFA em hipocampo de camundongos.
  
- II. Em camundongos jovens alimentados com uma dieta hipercalórica e submetidos à **terapia farmacológica** determinar:
  - a. Se o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> é efetivo em restaurar o dano de aprendizagem e memória em camundongos;
  - b. Se o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> modula a via das MAPKs e os níveis de proteínas inflamatórias na região hipocampal de camundongos;
  - c. Se o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> modula os níveis de proteínas pró e anti-apoptóticas na região hipocampal de camundongos.



### **3 DESENVOLVIMENTO**

O desenvolvimento desta tese está apresentado sob a forma de 1 artigo científico e 1 manuscrito em fase de redação. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências bibliográficas encontram-se no próprio artigo que está estruturado de acordo com as normas das revistas em que foi publicado e no manuscrito que se encontra em fase de redação.

Em anexo a esta tese encontram-se a autorização da editora para reprodução do artigo científico, bem como a aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria.

### 3.1 ARTIGO

**O fator nuclear eritroide 2-relacionado ao fator 2 e o fator de transcrição mitocondrial A contribuem para a ação efetiva da natação de intensidade moderada contra o dano de memória em camundongos induzidos pela exposição a uma dieta hipercalórica durante os períodos iniciais de vida.**

**Nuclear Factor [Erythroid-derived 2]-like 2 and Mitochondrial Transcription Factor A Contribute to Moderate-intensity Swimming Effectiveness against Memory Impairment in Young Mice Induced by Concomitant Exposure to a High-calorie Diet during the Early Life Period**

Natália da Silva Jardim, Sabrina Grendene Müller, Flávia Matos Pase e Cristina Wayne  
Nogueira



Neuroscience, 2020; ISSN: 0306-4522

DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.11.023

## Nuclear Factor [Erythroid-derived 2]-like 2 and Mitochondrial Transcription Factor A Contribute to Moderate-intensity Swimming Effectiveness against Memory Impairment in Young Mice Induced by Concomitant Exposure to a High-calorie Diet during the Early Life Period

Natália Silva Jardim, Sabrina Grendene Müller, Flávia Matos Pase and Cristina Wayne Nogueira\*

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

**Abstract**—Increased energy food consumption during early-life has been associated with memory impairment. Swimming training has been reported to improve memory processes in rodent models. This study aimed to evaluate whether moderate-intensity swimming training counteracts learning and memory impairment in young mice fed a high-calorie diet during the early-life period. The contribution of hippocampal oxidative stress, as well as nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2/Kelch-like ECH-associated protein (NRF2/Keap-1/HO-1) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-alpha/mitochondrial transcription factor A (PGC-1 $\alpha$ /mtTFA) signaling, in memory effects was also investigated. Three-week-old male Swiss mice received a high-calorie diet (20% fat; 20% carbohydrate enriched) or a standard diet from 21 to 49 postnatal days. Mice performed a moderate-intensity swimming protocol (5 days/week) and behavioral tests predictive of memory function. Mice fed a high-calorie diet and subjected to the swimming protocol performed better on short- and long-term spatial and object recognition memory tests than those fed a high-calorie diet. The swimming protocol modulated the hippocampal NRF2/Keap-1/HO-1 and mtTFA pathways in mice fed a high-calorie diet. Swimming training positively affected location and long-term memory, fat mass content, as well as NRF2/Keap-1/HO-1 and mtTFA proteins of control-diet-fed mice. In conclusion, a moderate-intensity swimming training evoked an adaptive response in mice fed a high-calorie diet by restoring different types of memory-impaired and hippocampal oxidative stress as well as upregulated the NRF2/Keap-1/HO-1 and mtTFA pathways. © 2020 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Key words:** memory, diet, early-life, hippocampus, brain, swimming.

### INTRODUCTION

Overconsumption of energy-dense diets potentially results in brain vulnerability, cognitive deficits, and dementia both in experimental models and human beings (Martin and Davidson, 2014; Noble and Kanoski, 2016). Especially during the early-life period, the brain is greater vulnerable to external and internal factors, representing a window of phenotypic plasticity that could critically impact in adult health (Kobayashi et al., 2014; Chen et al., 2019). The brain vulnerability is particularly problematic because the developmental periods are crucial for hippocampal maturation, a region critical for

learning and memory formation (Spear, 2000; Boitard et al., 2014).

It is well-established that diets enriched with fat or carbohydrates cause progressive loss of structure and function of neurons (Iqbal and Ahmed, 2019). Thus, the consumption of high-calorie diets increases oxidation of sulfhydryl groups of proteins, lipid peroxidation, and oxidative stress (Stranahan et al., 2011). The NRF2/Keap-1 (nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2 and Kelch-like ECH-associated protein) pathway activation is critical for reactive oxygen species scavenging, which contributes to neuroprotective effects on the central nervous system (CNS) (Sun et al., 2017).

One question that remains unanswered is how the intake of energy-dense diets affects the CNS during childhood because the juvenile/adolescent period is one of the rapid cerebral growth and maturation, which is critical for hippocampal development (Semple et al., 2013). Therefore, modulation of oxidative stress through the NRF2/Keap-1 pathway might contribute to moderate-intensity swimming training effects on memory

\*Corresponding author. Address: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900 RS, Brazil.

E-mail address: [criswn@ufsm.br](mailto:criswn@ufsm.br) (C. W. Nogueira).

**Abbreviations:** Keap-1, Kelch-like ECH-associated protein; LTM, long-term memory; mtTFA, mitochondrial transcription factor A; NRF2, nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2; PGC-1 $\alpha$ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-alpha.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.11.023>

0306-4522/© 2020 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



impairment in young mice fed a high-calorie diet, enriched with 20% fat and 20% carbohydrate, during the early-life period.

Health-promoting approaches, such as regular physical exercise, are recommended to improve the population lifestyle and reduce the risk of developing brain-related diseases (Klein et al., 2019). Physical activity is a non-pharmacological approach that prevents brain deterioration (Belviranli and Okudan 2019). Besides, regular aerobic exercise promotes neuroprotection (Lu et al., 2017) and improves cognitive (Maliszewska-Cyna et al., 2016) and non-cognitive (Cho et al., 2015) functions in animal models. Therefore, swimming activity has been reported to have benefits in rodent short- and long-term memory (Faria et al., 2016; Cechella et al., 2018).

Moreover, high-fat and high-carbohydrate diets exacerbate cognitive dysfunction by affecting mitochondrial function and producing free radicals in adult animals (Palomera-Avalos et al., 2017; Zhao et al., 2019). Notably, mitochondria play an essential role in neuron energy metabolism and neurotransmission (Knott et al., 2008). Aerobic exercise is known to induce mitochondrial adaptations via activation of PCG-1 $\alpha$ /mtTFA (peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1-alpha and mitochondrial transcription factor A) signaling (Jornayvaz and Shulman, 2010). Therefore, we hypothesize that the modulation of the PCG-1 $\alpha$ /mtTFA pathway plays a role in the mechanisms of memory impairment in young mice fed a high-calorie diet.

The present study aimed to evaluate whether a non-pharmacological therapy, moderate-intensity swimming, counteract memory impairment in young mice fed a high-calorie diet during the early-life period. This study also investigated the contribution of hippocampal NRF2/Keap-1/HO-1 and PCG-1 $\alpha$ /mtTFA signaling pathways in the swimming training effects of young mice exposed to a high-calorie diet.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Diet

The standard chow diet was enriched with lard (Sadia, Brazil) and corn syrup (inverted sugar) (Yoki, Brazil) (Table 1). The high-calorie diet was prepared by gradually incorporating 20% lard (fat) and 20% corn syrup (carbohydrate) (w/w) to the standard powdered commercial diet (NuviLab CR-1®) (Table 1). The diet was constantly mixed for 10 min to obtain a homogeneous mixture. Then, water was added to this mixture to obtain a mash. The mash was manually shaped in pellets that were dried on a laboratory stove.

The composition of the high-calorie diet was chosen based on previously published studies (Lu et al., 2017; Matheus et al., 2017). The standard diet contains 40.5% carbohydrate and 1.5% lipid. Thus, the high-calorie diet was prepared by adding 20% of corn syrup (80 g/100 g), 20% of lard (100 g/100 g) to a 60% of the standard diet; creating a high-calorie diet with 42.3% carbohydrate (being 20% of corn syrup), 20.9% lipid (being 20% of lard).

Table 1. Nutritional composition of sources used to high-calorie diet preparation

Standard diet (NuviLab CR-1®)	
	g/100
Carbohydrate	40.5 g
Protein	16.2 g
Lipid	1.5 g
Fibers	7.0 g
Energetic value 295 kcal	
Corn syrup (Yoki)	
	g/100
Carbohydrate	80 g
Energetic value 325 kcal	
Lard (Sadia)	
	g/100
Lipid	100 g
Energetic value 900 kcal	

Values were obtained from manufacturers.

The standard diet (2.95 kcal/g) had low energy-density than the high-calorie diet (4.22 kcal/g). The final energy density of the high-calorie diet was calculated based on kcal of constituents informed by manufacturers (Table 1).

### Animals

Sixty-four three-week-old male Swiss mice (initially 13–16 g) were used in this experimental protocol. The animals were housed in polypropylene cages (four mice per cage) and kept under controlled conditions with a constant temperature ( $22 \pm 3$  °C), in a 12 h light/dark cycle with lights turned on at 07:00 a.m. Mice had free access to water and a commercial diet (NuviLab CR-1®, RS/Brazil) or a high-calorie diet. Mice from different experimental groups were allocated in different cages (two cages per group, eight cages per cohort, totalizing 16 cages). The present study was approved by the institutional Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria, Brazil (number #7134140318/2017). All efforts were made to minimize the animal's suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

### Experimental design

Mice were randomly assigned to four different experimental groups as follows: Control diet (CD): mice fed a standard diet and sedentary; High-calorie diet (HCD): mice fed a high-calorie diet and sedentary; Control diet + Swimming (CD + S): mice fed a standard diet and subjected to the swimming protocol; High-calorie diet + Swimming (HCD + S): mice fed a high-calorie diet and subjected to the swimming protocol.

Fig. 1 shows that mice were exposed to a high-calorie diet for 4 weeks during the postnatal day (PND) 21–49. Mice were exposed to a high-calorie diet in this period



because the brain development begins in the pregnancy and continues during the early-life stage, from postnatal to youth period, in rodents and human beings (Stiles and Jernigan, 2010; Semple et al., 2013; Loi et al., 2017). Mice were daily monitored for clinical signs (abnormal behavior), body weight, and food intake.

Food intake was measured as reported in the literature (Moir et al., 2016; Muhsin et al., 2020), providing an average intake/mouse. Briefly, mice were group-housed four per cage; each cage received a known amount of standard diet or high-calorie diet. Twenty-four-hour intake was measured as the difference in weight between the diet put into the cage and that remaining at the end of 24 h. Diets were weighed daily between 9 a. m. and 10 a.m. for 28 days (21–49 PND). The daily average intake for each mouse was calculated by dividing the value of the 24 h intake by the number of mice per cage (4). To generate the data for the food intake, only mice of the second cohort were used ( $n = 8$  mice per group, total 32).

The moderate-intensity swimming protocol (Fig. 1) was adapted based on the study of Mazzardo-Martins et al. (2010). Initially, all mice were adapted to the new environment, in which they were exposed to water for 1 min on the first day. After that, the mice, in swimming groups, were subjected to an adaptation period (2 min/day, 4 days). This protocol was progressively increased in the second (10 min/day, 5 days), third (15 min/day, 5 days), and fourth (30 min/day, 5 days) weeks. The swimming time was determined based on the mouse exhaustion time, observed during each week of this protocol, which was defined as the point (in min) where the mouse remained below the water surface for 5 s (Dawson et al., 1968; Wang et al., 2020). The training occurred in the water at a temperature of  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$  between 2.00 p.m. and 4.00 p.m. At the end of the

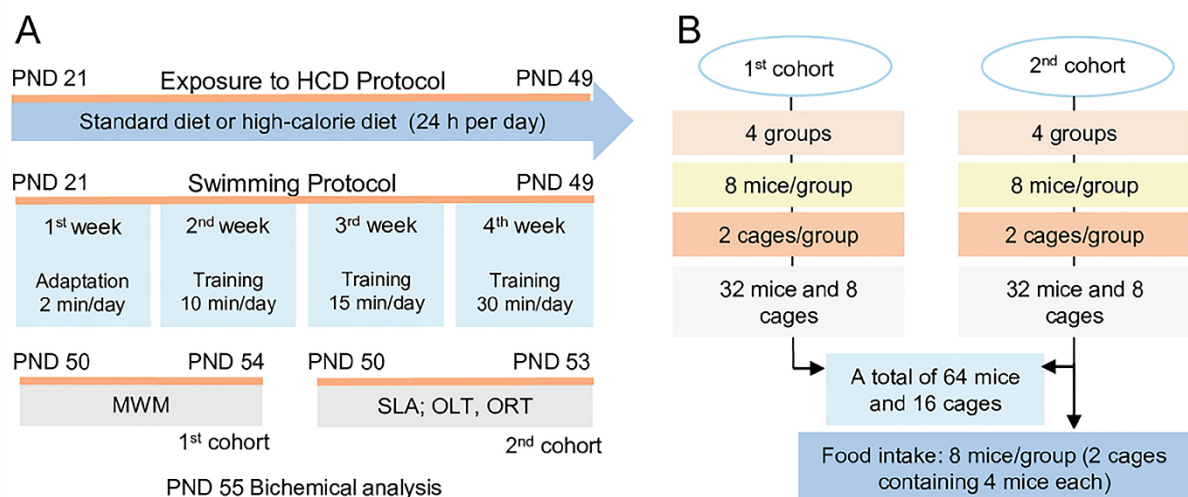
moderate-intensity swimming training, mice were towel-dried and returned to their respective cages. The adaptation to the water consisted of placing sedentary mice at the bottom of a separate tank with shallow water (5 cm) at  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

This study consisted of two experimental cohorts of animals, which were subjected to the same treatment schedule (Fig. 2); in the first cohort (32 mice), animals performed the Morris Water Maze test (MWM) ( $n = 8$  animals per group) which was carried out from PND 50 to 54. The spontaneous locomotor activity ( $n = 8$  animals per group), object recognition test (ORT) ( $n = 8$  animals per group), and object location test (OLT) ( $n = 8$  animals per group) were performed by mice of the second cohort (32 mice), which was carried out from PND 50 to PND 53.

Twenty-four h after the end of behavioral tests, the mice were euthanized by cervical dislocation, the brains were collected; hippocampi were excised and stored at  $-80^{\circ}$  until *ex vivo* analyses. Epididymal fat was collected only from the second cohort of mice ( $n = 8$  animals per group). The weight of epididymal fat tissue was used to calculate the epididymal fat accumulation. Results were expressed as relative epididymal fat weight – fat (g)/body weight (g).

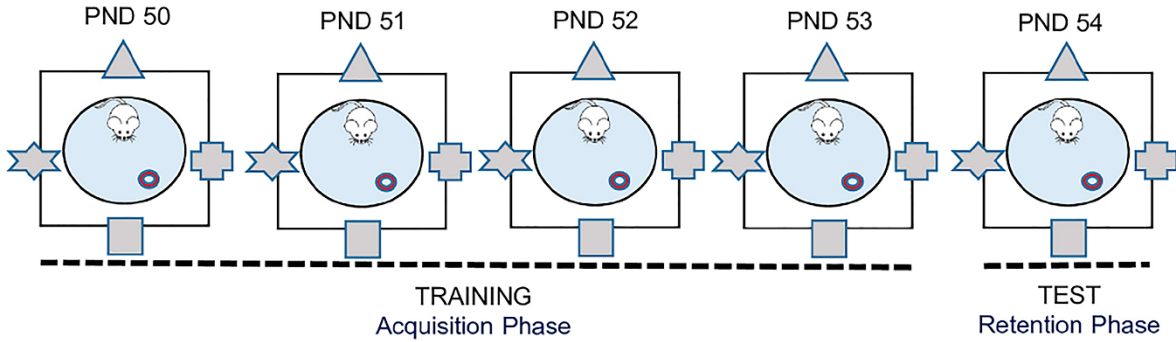
#### Behavior tests

**Morris water maze test.** The test was conducted as described by Morris (1984), but with modifications. The experiment consisted of acquisition trials (4 days of training) and one probe test on the 5th day to evaluate the spatial memory retention in mice. During the acquisition phase, the animals were placed next to and facing the wall successively in north, south, east, and west



**Fig. 1.** Schematic illustration of the experimental protocol. (A) Male mice were exposed to a high-calorie or standard diet from PND 21 to 49. Mice performed a moderate-intensity swimming training, which was progressively increased during the weeks (PND 21–49). Behavioral tests were carried out in two different cohorts of animals (first cohort: PND 50–54 and second cohort: PND 50–53). (B) Schematic representation of distribution of the mice in this study. PND: postnatal day; MWM: Morris Water Maze test; SLA: Spontaneous Locomotor Activity; OLT: object location test; ORT: object recognition test.

□ First cohort of mice (*Morris Water Maze test*)



□ Second cohort of mice (*Object location and recognition tests*)

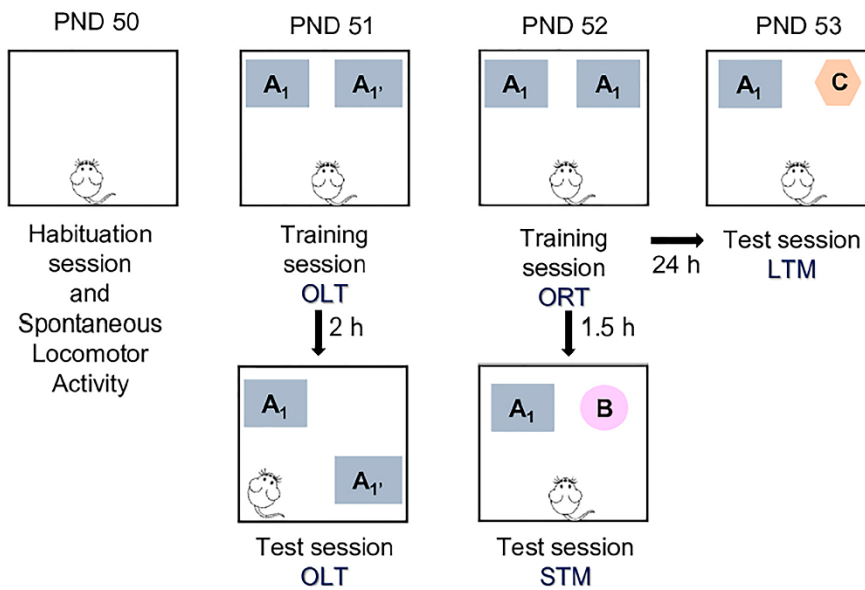


Fig. 2. Schematic view of the behavior tests carried out in this study. The Morris Water Maze test was performed by mice of the first cohort of animals. The object location test (OLT) and object recognition test (ORT) were performed by mice of the second cohort. STM: short-term memory; LTM: long-term memory; PND: postnatal day.

positions. A platform (10 cm in diameter) was installed in the center of the northwest quadrant and submerged 2 cm below the water surface, the platform was camouflaged either by placing opacifying materials (maize starch) in the water. The latency to reach it was measured in four trial sessions for 4 days, and it was calculated as the mean of total time spent in four trials of each day. The animals remained on the platform for at least 40 s after each trial. Whenever the mice failed to reach the escape platform within the 60 s cut-off period, they were retrieved from the pool and placed on it for 40 s. After the swim, the mice were kept dry in a plastic holding the cage filled with paper towels. One day after the last day of the acquisition phase, a test trial was conducted by removing the platform and placing the mice next to the south position and facing the north side. The maze consisted of a black circular pool (109 cm in diameter, 80 cm height) divided into four imaginary quadrants and filled to a depth of

50 cm with water ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). The pool was placed in a room with several extra maze visual cues. A camera hung above the pool recorded the behavior. The distance (cm) traveled and time spend (s) in the target quadrant were measured for a single 60 s in the test day. The mean swimming speed (m/s) and distance traveled (m) were analyzed using appropriate video-tracking software (ANY-maze™, Stoelting CO, USA, version 5.11).

*Spontaneous locomotor activity.* The spontaneous locomotor activity of mice was evaluated to discard interferences on motor coordination and exploratory capacity caused by a high-calorie diet. Mice performed the behavior test in a clear acrylic plastic box (50 cm × 48 cm × 50 cm) connected to a monitor with photocell beams and equipped with 16 infrared sensors for the automatic recording of general locomotor activity and the animal position (Insight, Ribeirao Preto, SP,



Brazil). Each animal was placed in the center of the apparatus and allowed to freely explore the arena for 4 min. The numbers of crossings, rearing, and total distance traveled were recorded.

**Object location test.** The OLT, a hippocampus-dependent spatial memory test, was carried out according to [Takahashi et al. \(2009\)](#), but with modifications. The test consisted of a 10 min habituation session in which the mice were left to freely exploring the open-field. No object was placed in the field during the habituation session. Twenty-four h after, they were exposed to two identical objects (duple Lego toys), positioned one (A1) parallel to the other (A1') in which mice explored the open-field for 5 min (training session). Two h after the training session, an object (A1') was moved to a novel location that was diagonally opposite to object A1 (object in the familiar location), and the animal was left in the field for 5 min exploration (test session). The time spent by mice exploring the objects was recorded by an experimenter using a stopwatch and unaware of the experimental conditions. The object localization index was calculated for each animal by the formula:  $[TA1' / (TA1 + TA1')] * 100$ . [TA1 = time spent exploring the object in the familiar location A1; TA1' = time spent exploring the object in a novel location A1']. The results were expressed as an index (%).

**Object recognition test.** The ORT was carried out to investigate short- and long-term memory ([Rosa et al., 2003](#)). The test was carried out in the open-field used for the OLT. Mice were subjected to a training session (5 min) with two identical objects (objects A1; duple Lego toys). In the short-term memory (STM), the test was carried out 1.5 h after training; the mice explored the open-field for 5 min in the presence of one familiar (A1) and a novel object (B). The long-term memory (LTM) was carried out 24 h after the training session. In this test, the same animal explored the field for 5 min in the presence of a familiar object (A1) and a novel object (C). The time spent by mice exploring the objects was recorded by an experimenter using a stopwatch and unaware of the experimental conditions. A percentage of the total time, which the animal spent, exploring the novel object, was defined as a measure of recognition memory. The object recognition index was calculated for each animal by the formula: [time spent exploring the novel object divided by total exploration time \* 100]; [STM =  $(B / (A1 + B)) * 100$ ; LTM =  $(C / (A1 + C)) * 100$ ]. The results were expressed as an index (%).

#### Oxidative stress parameters

**Tissue preparation:** Samples of the hippocampus were homogenized (1:5 w/v) in cold 50 mM Tris HCl at pH 7.4 and centrifuged at  $2500 \times g$  for 10 min at 4 °C to yield a low-speed supernatant (S1) fraction. The S1 was used to determine oxidative stress parameters; non-protein thiol (NPSH) ( $n = 22$  mice; 5/6 per group) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ( $n = 22$  mice; 5/6 per group) levels. Protein concentration in S1 was determined according to the method of [Bradford](#)

(1976), using bovine serum albumin (1 mg/ml) as a standard.

**Thiobarbituric acid reactive substances levels:** Lipid peroxidation was determined by measuring TBARS levels in the hippocampus samples, according to [Ohkawa et al. \(1979\)](#). An aliquot of S1 was incubated with 0.8% thiobarbituric acid, acetic acid buffer pH 3.4, and 8.1% sodium dodecyl sulfate at 95 °C for 2 h. The color reaction was measured at 532 nm. Results were expressed as nmol equivalents of malondialdehyde (MDA)/mg protein.

**Non-protein thiol levels:** The NPSH content is a non-enzymatic antioxidant defense, which was determined according to the method described by [Ellman \(1959\)](#). The S1 was mixed (1:1) with 10% trichloroacetic acid and centrifuged at  $3000 \times g$  for 10 min. After, the protein pellet was discarded and free -SH groups were determined in the clear supernatant. An aliquot of the supernatant was added in 1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, and 10 mM DTNB. The color reaction was measured at 412 nm. NPSH levels were expressed as nmol Glutathione equivalents/g tissue.

#### Molecular analysis

**Western blotting assay.** Hippocampus samples ( $n = 22$  mice; 5/6 per group) were homogenized in ice-cold RIPA lysis buffer containing proteases and phosphatases inhibitor cocktail. The final protein concentration, in each sample, was adjusted to 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  with a sample buffer containing Tris HCl 0.5 M, pH 6.8, glycerol, 10% sodium dodecyl sulfate [SDS], 2-mercaptoethanol, and bromophenol blue. The protein concentration was measured using the Bicinchoninic acid Kit (BCA assay). The samples (30  $\mu\text{g}$  of protein) and pre-stained molecular weight standards were separated on 10% at 14% SDS-PAGE electrophoresis gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membrane (0.45  $\mu\text{m}$ , Bio-rad) using Transfer-Blot® Turbo™ Transfer System (1.0A; 30 min) and blocked with 3% albumin solution. The protein loading was confirmed by Ponceau S staining. Subsequently, the blots were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody ([Table S1](#), see [supplementary material](#)). After, membranes were washed and incubated with the respective secondary antibodies, which had a horseradish peroxidase-conjugated, over 1 h at room temperature. For protein detection, a chemiluminescence kit (Amersham, São Paulo/Brazil) was used and the signals were captured with Amersham Imager 600 (GE healthcare life sciences). Optical density (O.D.) of the blotting bands was quantified using Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) software for Windows. Each value was derived from the ratio between arbitrary units obtained by the protein band quantification and the respective protein content of the  $\beta$ -Actin band. Data were expressed as the percentage of control.

#### Statistical analysis

The normality of data distribution was confirmed by the Shapiro-Wilk test (all  $p$ s > 0.05). Levene's test (all



$p > 0.05$ ) was used to assess the equality of variances across groups. Parametric data were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) [high-calorie diet  $\times$  swimming] followed by the Tukey HSD *post hoc* test for multiple comparisons. The main effects were presented only when the higher (second) order interaction was non-significant. The data on escape latency in the training session of MWM were analyzed by three-way mixed ANOVA followed by the Tukey HSD *post hoc* test. Probability values  $< 0.05$  ( $p < 0.05$ ) were considered as indicative of significance. The software Statistica10 was adopted for the statistical analyses. Bars plots and Box-and-whiskers plots were created using GraphPad Prism 8 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and constructed from minimum to maximum to show all points. Data are expressed as median and the interquartile range (25th–75th percentiles). Pearson's correlation coefficient was used for measuring the statistical relationship between two variables.

## RESULTS

### Exposure to a high-calorie diet increases food intake and epididymal fat mass content without altering the mouse body weight gain

Fig. 3A demonstrates the food intake of mice exposed to a high-calorie diet during the postnatal period.

The two-way ANOVA analysis of epididymal fat data revealed a significant difference for *high-calorie diet*  $\times$  *swimming* interaction ( $F_{1,28} = 8.94$ ;  $p = 0.005$ ) and significant main effects for *swimming* ( $F_{1,28} = 17.09$ ;  $p < 0.001$ ) and *high-calorie diet* ( $F_{1,28} = 22.17$ ;  $p < 0.001$ ). Tukey HSD *post hoc* comparisons demonstrated an increase of the relative weight of the epididymal fat in mice exposed to a high-calorie diet when compared to the control diet group (Fig. 3B). Swimming training reduced the relative weight of the epididymal fat in mice fed a high-calorie diet (Fig. 3B).

Although the high-calorie diet increased the epididymal fat mass content in mice, analyses of the body weight gain data demonstrated no statistically significant difference among mice of all experimental groups (Table S2, see supplementary material). Pearson's analysis indicated a positive correlation between cumulative food intake and the epididymal fat mass ( $r = 0.72$ ;  $p < 0.001$ ; Fig. 3C), suggesting the influence of high-calorie diet consumption in the mouse epididymal fat mass deposition.

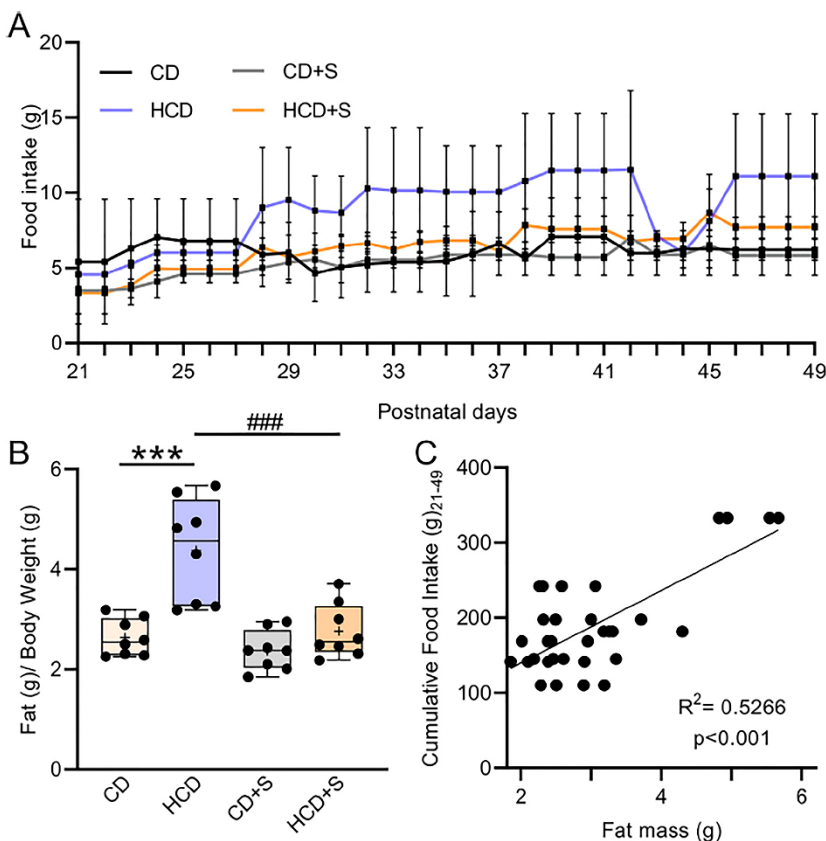


Fig. 3. Effects of moderate-intensity swimming protocol on food intake and relative fat weight of mice exposed to a high-calorie diet. (A) Food intake (B) Relative fat weight, and (C) Cumulative Food intake from PND 21 to 49 and fat mass correlation (Pearson's correlation coefficient). Data are expressed as median (25th and 75th percentiles) and analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc* test. (\*) $p < 0.05$  and (\*\*\*) $p < 0.001$  vs. CD group; (#) $p < 0.001$  and (###) $p < 0.001$  vs. HCD group;  $n = 8$  animals per group (2 cages per group). CD – control diet, HCD – high-calorie diet, CD + S – control diet + swimming, HCD + S – high-calorie diet + swimming.

### Moderate-intensity swimming training protects against spatial memory impairment induced by exposure to a high-calorie diet in mice

Table 2 shows that swimming speed and total distance traveled data did not differ between the groups in the MWM test.

The three-way ANOVA mixed analysis of escape latency showed a significant main effect for time factor ( $F_{1,112} = 9.97$ ;  $p < 0.001$ ). On 2nd day of training, mice fed a high-calorie diet had increased the latency to reach the hidden platform when compared to the control diet group. All experimental groups, excepting the high-calorie diet, decreased the latency to reach the platform over the training days (Fig. 4A).



**Table 2.** Effects of swimming training on locomotor parameters of mice exposed to a high-calorie diet during the early-life period

Groups	MWM	
	Average swimming speed (cm/s)	Total distance traveled (cm)
CD	0.03 (0.02–0.04)	1.6 (1.2–2.4)
HCD	0.03 (0.02–0.03)	1.8 (1.4–1.9)
CD + S	0.03 (0.02–0.04)	1.9 (1.5–2.3)
HCD + S	0.03 (0.03–0.04)	2.0 (1.5–2.7)

Data were expressed as median (25th and 75th percentile);  $n = 8$  animals per group. Data were analyzed by two-way ANOVA. MWM – Morris Water Maze. CD – control diet, HCD – high-calorie diet, CD + S – control diet + swimming, HCD + S – high-calorie diet + swimming.

The two-way ANOVA analysis of time spent and distance traveled in the target quadrant showed a significant difference for *high-calorie diet*  $\times$  *swimming* interaction (time:  $F_{1,28} = 13.96$ ;  $p < 0.001$  and distance:  $F_{1,28} = 5.40$ ;  $p = 0.027$ ). Tukey HSD *post hoc* comparisons indicated that mice fed a high-calorie diet significantly decreased the time spent and distance traveled in the target quadrant when compared to the control diet group (Fig. 4B, C). Swimming training effectively protected against the decrease in the time spent in the target quadrant of mice exposed to a high-calorie diet (Fig. 4B).

#### Moderate-intensity swimming training is effective against memory impairment, in the OLT and ORT, induced by exposure to a high-calorie diet in mice

The results depicted in Table 3 show the effects of swimming training on spontaneous locomotor activity parameters of mice exposed to a high-calorie diet. The two-way ANOVA analysis of total distance traveled, number of crossings and rearings showed a non-significant difference ( $p > 0.05$ ) among the experimental groups.

In OLT and ORT training sessions, all animals spent a similar time exploring both objects (50% of the time) (Fig. 5).

The two-way ANOVA analysis of the localization index revealed significant main effects for *swimming* ( $F_{1,28} = 9.65$ ;  $p < 0.01$ ) and *high-calorie diet* ( $F_{1,28} = 20.63$ ;  $p < 0.001$ ). *Post hoc* data showed that the exposure to a high-calorie diet decreased the localization index of mice when compared to the control diet group (Fig. 6). Swimming training was effective against the decrease in the localization index of mice fed a high-calorie diet.

The two-way ANOVA of recognition index in the STM and LTM showed a significant difference for *high-calorie diet*  $\times$  *swimming* interaction (STM:  $F_{1,28} = 11.23$ ;  $p = 0.002$  and LTM:  $F_{1,28} = 21.98$ ;  $p < 0.001$ ) and significant main effects for *swimming* (LTM:  $F_{1,28} = 5.86$ ;  $p = 0.022$ ) and *high-calorie diet* (STM:  $F_{1,28} = 6.58$ ;  $p = 0.015$  and LTM:  $F_{1,28} = 54.16$ ;  $p < 0.001$ ). *Post hoc* comparisons showed that mice exposed to a high-calorie diet had a decrease in the

recognition index in STM and LTM when compared to the control diet group (Fig. 6). Swimming training was effective against the decrease of STM and LTM recognition indexes of mice fed a high-calorie diet.

#### Moderate-intensity swimming regulates oxidative stress aggravated by exposure to a high-calorie diet during the early-life

The two-way ANOVA of TBARS and NPSH levels revealed a significant difference for *high-calorie diet*  $\times$  *swimming* interaction (TBARS:  $F_{1,18} = 14.09$ ;  $p = 0.001$  and NPSH:  $F_{1,18} = 7.28$ ;  $p = 0.011$ ) and a significant main effect for *swimming* (NPSH:  $F_{1,18} = 15.05$ ;  $p = 0.001$ ). Tukey HSD *post hoc* data showed an increase of TBARS levels in the hippocampus of mice fed a high-calorie diet when compared to the control group (Fig. 7A). The *post hoc* comparisons of the hippocampal NPSH indicated a decrease of these levels in mice exposed to a high-calorie diet when compared to the control group (Fig. 7B). Moderate-intensity swimming protected against either the increase in TBARS or the decrease in NPSH in the hippocampus of diet-exposed mice. Swimming training presented a *per se* effect in the NPSH levels when compared to the high-calorie diet group (Fig. 7B).

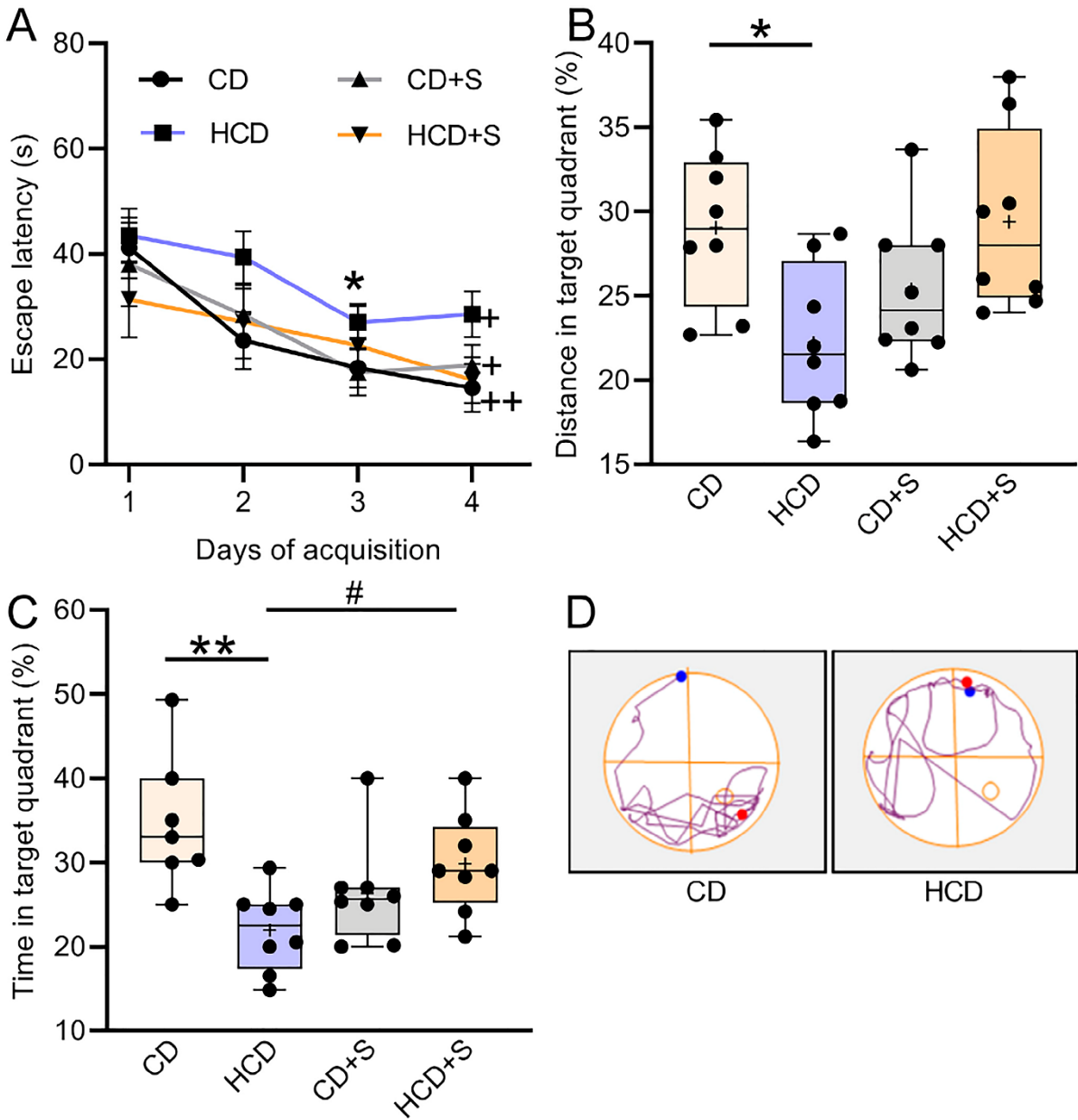
#### There is a relationship between memory impairment, oxidative stress, and epididymal fat mass

Correlation analyses between the epididymal fat mass and the other parameters investigated were performed to try excluding uncontrollable biases caused by the dominance hierarchy in the cage, which could affect the mouse calorie intake. Pearson's linear regression data revealed a negative correlation between the epididymal fat mass  $\times$  the OLT index ( $r = -0.8740$ ); the epididymal fat mass  $\times$  the STM index ( $r = -0.8690$ ); the epididymal fat mass  $\times$  the LTM index ( $r = -0.6064$ ), and the epididymal fat mass  $\times$  the NPSH levels ( $r = -0.6081$ ); and a positive correlation between the epididymal fat mass  $\times$  the TBARS levels ( $r = 0.7198$ ).

#### Moderate-intensity swimming training modulates oxidative stress and NRF2/Keap-1 signaling pathway in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet

The two-way ANOVA of HO-1 levels revealed a significant difference for *high-calorie diet*  $\times$  *swimming* interaction ( $F_{1,18} = 4.55$ ;  $p = 0.046$ ) and significant main effects for *swimming* ( $F_{1,18} = 7.64$ ;  $p = 0.012$ ) and *high-calorie diet* ( $F_{1,18} = 10.21$ ;  $p = 0.005$ ). Tukey HSD *post hoc* analysis showed that swimming training was effective against the increase in the hippocampal HO-1 levels of mice exposed to a high-calorie diet (Fig. 8A).

The two-way ANOVA of NRF2 levels and NRF2/Keap-1 ratio revealed a significant difference for *high-calorie diet*  $\times$  *swimming* interaction (NRF2:  $F_{1,18} = 10.31$ ;



**Fig. 4.** Effects of moderate-intensity swimming protocol on the MWM test of mice exposed to a high-calorie diet. (A) Latency to reach the hidden platform in the training session (acquisition phase), (B) Time spent and (C) Distance traveled by mice in the target quadrant during the test trial session, and (D) Swimming paths of CD (left) and HCD (right) mice during the probe trial session. Data are expressed as median (25th and 75th percentiles) and analyzed by three-way repeated measures and ordinary two-way ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc* test. (\*) $p < 0.01$  and (\*\*) $p < 0.01$  vs. CD group; (#) $p < 0.05$  vs. HCD group; (+) $p < 0.05$  vs. day 1 of CD + S group; (++) $p < 0.05$  vs. day 1 of HCD + S group; (+++)  $p < 0.05$  vs. day 1 of CD group;  $n = 8$  animals per group. CD – control diet, HCD – high-calorie diet, CD + S – control diet + swimming, HCD + S – high-calorie diet + swimming.

$p = 0.004$  and ratio:  $F_{1,18} = 8.59$ ;  $p = 0.009$ ) and a significant main effect for *swimming* (NRF2:  $F_{1,18} = 11.06$ ;  $p = 0.003$  and ratio:  $F_{1,18} = 11.22$ ;  $p = 0.003$ ). *Post hoc* comparisons showed that swimming training protected against the decrease in the hippocampal NRF2 levels and the NRF2/Keap-1 ratio of mice exposed to a high-calorie diet (Fig. 8B and 8C).

**Moderate-intensity swimming training effects on mtTFA levels in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet**

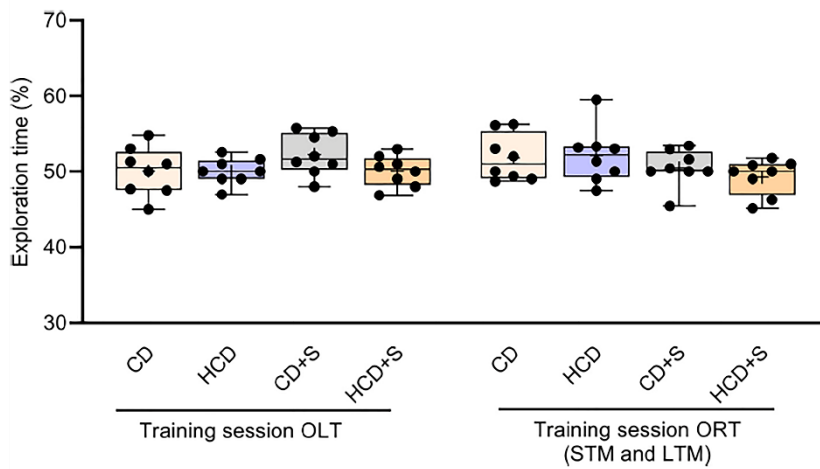
The two-way ANOVA of PGC-1 $\alpha$  levels only indicated a main effect for *high-calorie diet* ( $F_{1,18} = 7.65$ ;  $p = 0.012$ ) (Fig. 9A). The two-way ANOVA of mtTFA



**Table 3.** Effects of moderate-intensity swimming on spontaneous locomotor parameters of mice exposed to a high-calorie diet during the early-life period

Groups	Spontaneous locomotor activity		
	Rearing ( <i>n</i> )	Crossing ( <i>n</i> )	Distance ( <i>m</i> )
CD	21.3 (19.0–29.7)	679.5 (631.3–805.0)	12.4 (11.0–14.7)
HCD	24.0 (22.2–26.2)	658.0 (569.0–789.8)	12.5 (11.5–14.9)
CD + S	22.0 (16.5–27.5)	717.5 (629.5–939.3)	12.5 (11.3–16.5)
HCD + S	23.0 (18.7–27.5)	793.5 (692.3–875.5)	13.6 (11.8–15.3)

Data were expressed as median (25th and 75th percentile); *n* = 8 animals per group. Data were analyzed by two-way ANOVA. (*n*): data are expressed as the number of rearing/crossing; (*m*): data are expressed as meters. CD – control diet, HCD – high-calorie diet, CD + S – control diet + swimming, HCD + S – high-calorie diet + swimming.

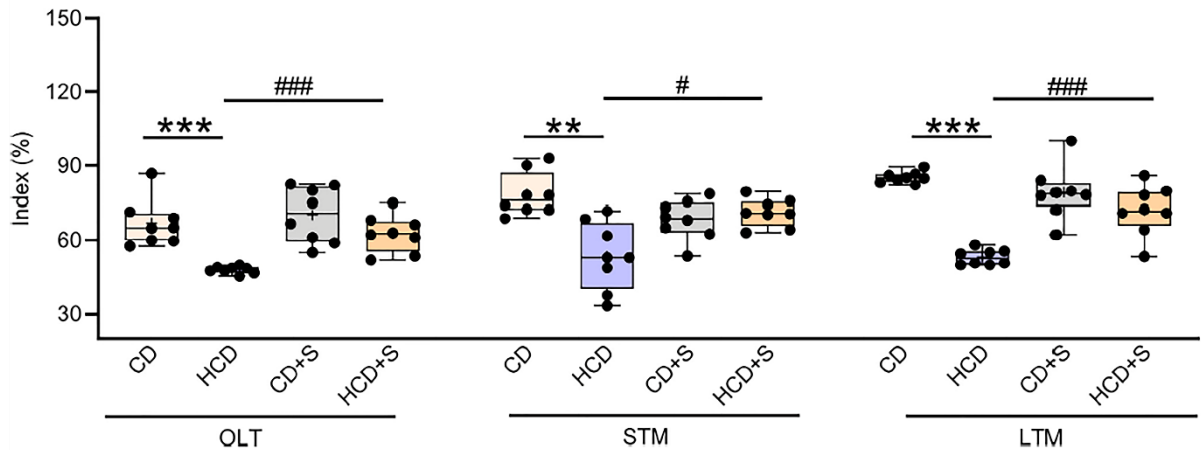


**Fig. 5.** Effects of moderate-intensity swimming protocol on the training session (OLT and ORT) of mice exposed to a high-calorie diet. Data are expressed as median (25th and 75th percentiles) and analyzed through two-way ANOVA followed. HCD group; *n* = 8 animals per group. CD – control diet, HCD- high-calorie diet, CD + S – control diet + swimming, HCD + S – high-calorie diet + swimming.

levels revealed a significant difference for *high-calorie diet* × *swimming* interaction ( $F_{1,18} = 6.06$ ;  $p = 0.024$ ) and a significant main effect for *high-calorie diet* ( $F_{1,18} = 15.84$ ;  $p < 0.001$ ). *Post hoc* comparisons revealed a decrease in the hippocampal levels of mtTFA (Fig. 9B) when compared to the control diet group. Fig. 9B shows that swimming training was effective against the decrease in the hippocampal levels of mtTFA in mice fed a high-calorie diet.

**DISCUSSION**

The present findings demonstrate that early-life exposure to a high-calorie diet (containing 20% lard and 20% corn syrup) impaired spatial, short- and long-term



**Fig. 6.** Effects of moderate-intensity swimming protocol on the OLT and ORT of mice exposed to a high-calorie diet. OLT (2 h after training), STM (1.5 h after training), and LTM (24 h after training). Data are expressed as median (25th and 75th percentiles) and analyzed through two-way ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc* test. (\*\*) $p < 0.01$  and (\*\*\*) $p < 0.001$  vs. CD group; (#) $p < 0.05$ , (###) $p < 0.001$  vs. HCD group; *n* = 8 animals per group. OLT – object location test, ORT – object recognition test, STM – short-term memory, LTM – long-term memory, CD – control diet, HCD – high-calorie diet, CD + S – control diet + swimming, HCD + S – high-calorie diet + swimming.

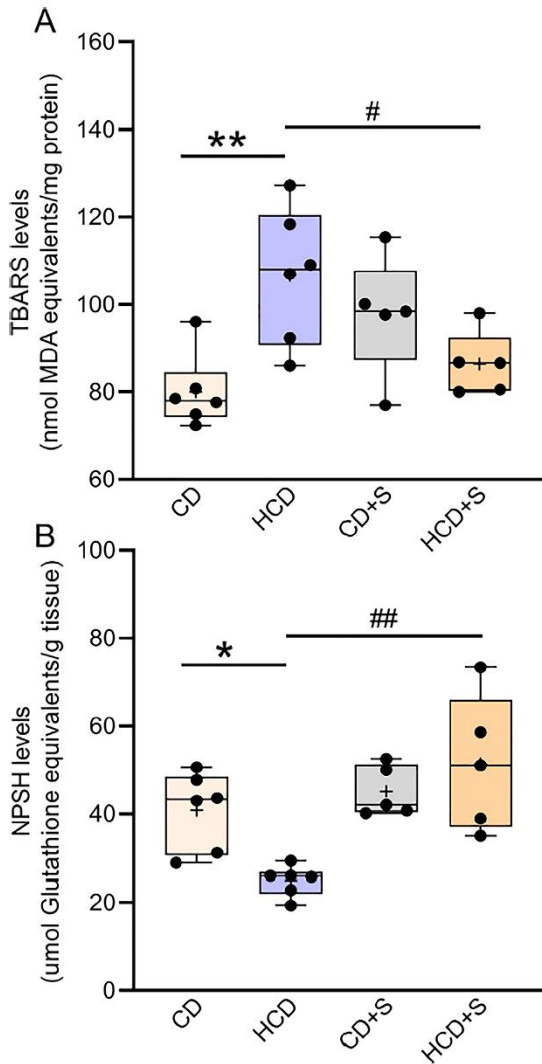


Fig. 7. Effects of moderate-intensity swimming protocol on (A) TBARS and (B) NPSH levels in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet. Data are expressed as median (25th and 75th percentiles) and analyzed by two-way ANOVA followed by the Tukey HSD *post hoc* test. (\*) $p < 0.05$  and (\*\*)  $p < 0.01$  vs. CD group; (#)  $p < 0.05$  and (##)  $p < 0.01$  vs. HCD group;  $n = 5/6$  animals per group. CD – control diet, HCD – high-calorie diet, CD + S – control diet + swimming, HCD + S – high-calorie diet + swimming.

object recognition in young mice. The molecular analyses provide evidence that exposure to a high-calorie diet in the early-life modulated hippocampal oxidative stress and NRF2/Keap-1/HO-1 and PCG-1 $\alpha$ /mTFA signaling pathways, suggesting the contribution of these mechanisms in learning and memory negative effects (Fig. 10). Regarding the beneficial effects of moderate-intensity swimming protocol, this non-pharmacological therapy was effective against learning and memory impairment, metabolic and molecular alterations in young mice exposed to a high-calorie diet in the early-life.

In the present study, the effects of a high-calorie diet on the body weight gain of mice were notably divergent among the findings reported in the scientific literature (Liu et al., 2017; Matheus et al., 2017). Our results indicate that the increase of a high-calorie diet intake did not account for an increase in the body weight gain but was positively correlated with an increase in the epididymal fat mass of mice. The conflicting results from earlier studies on the body weight gain are attributed to differences found among the experimental protocols, such as exposure time and diet composition (Boitard et al., 2012; Liu et al., 2017; Matheus et al., 2017; Nakaoka et al., 2019).

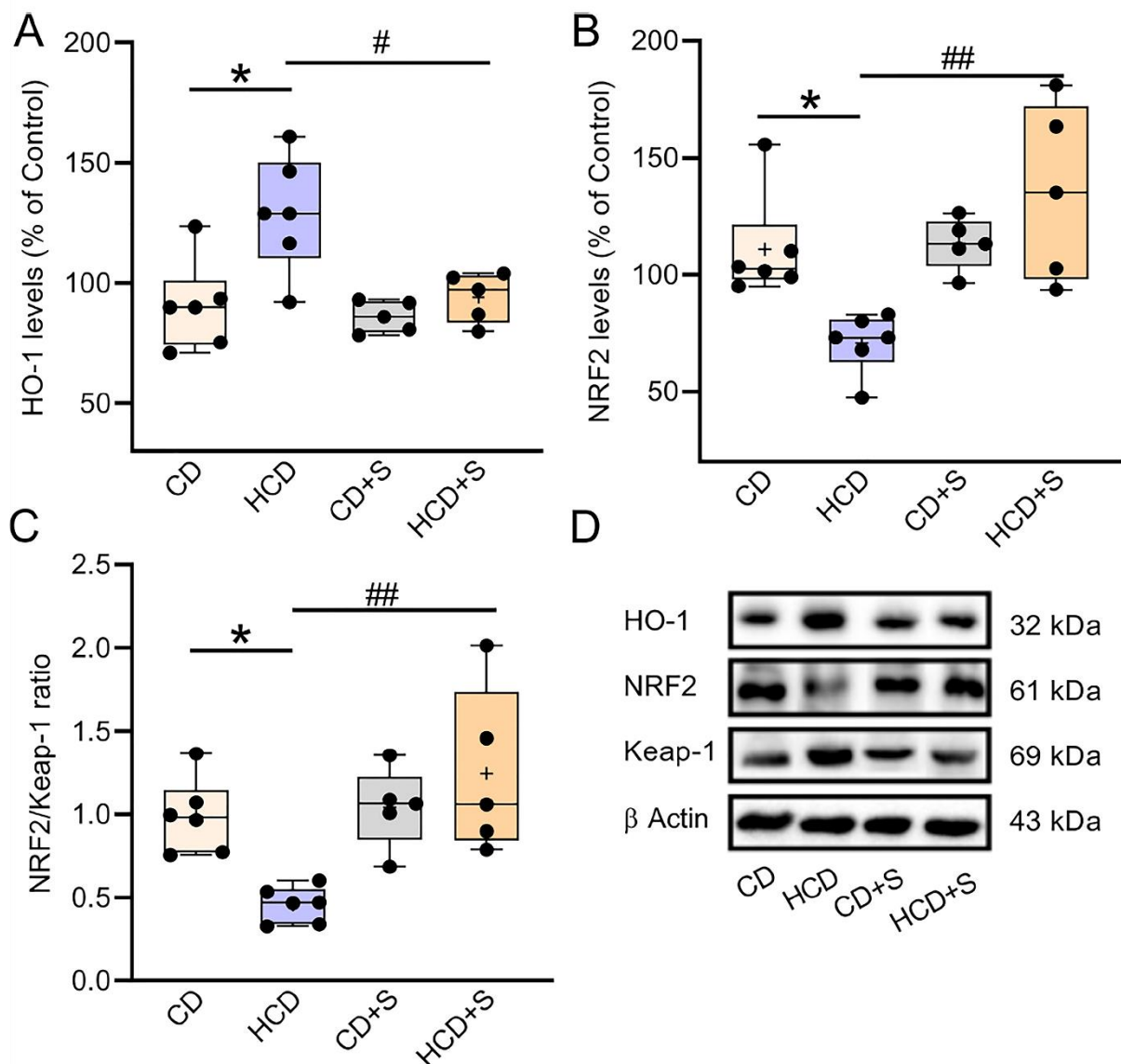
Moreover, some details in the experimental design, such as food intake measured per cage in mice group-housed, could represent a bias caused by a natural hierarchy formation of the mice, which could affect calorie intake. The correlation analyses between the epididymal fat mass and the other parameters investigated indicate that there is a relationship between memory impairment, oxidative stress, and the epididymal fat mass, excluding uncontrollable biases caused by the dominance hierarchy in our experimental protocol.

In the course of early life-stages, the consumption of hypercaloric foods may show detrimental effects because the immature CNS is vulnerable to injury from different exogenous agents (Andersen, 2003; Dridi et al., 2014). Thereby, the results of the present study demonstrate that the high-calorie diet intake, during the brain development period, induced hippocampus-dependent learning and memory impairment in mice. The harmful effects of a high-calorie diet on memory were revealed by the difficulty of mice in recognizing the new objects (ORT), the object new localization (OLT), and failing to find the platform, which indicate impairment in spatial, location, and recognition memories.

Evidence has been found to suggest that the mice performance in the OLT and ORT is mainly associated with the hippocampal region and that any insult, such as the dietary, in this brain structure, may lead to learning and memory impairments (Kanoski and Davidson, 2010; Heyward et al., 2012; Beilharz et al., 2014; Izquierdo et al., 2017). Similarly, the performance in the MWM test is positively correlated to the hippocampal function (Cordner and Tamashiro, 2015), which is responsible for the integration of spatial learning and memory information (Vorhees and Williams, 2014). The findings obtained in the MWM test indicate that exposure to a high-calorie diet during the early-life impaired the spatial learning and memory of mice. Besides, the experimental protocol of the present study did not reveal alteration in the spontaneous locomotor behavior of mice, discarding the possible potential artifacts in their performance in the MWM, OLT, and ORT.

Although the present study used a moderate variation in the composition of macronutrients (only 20% fat and 20% carbohydrates) of diet, our results were similar to those that associate the consumption of the high-fat or high-carbohydrate diet with cognition impairment in rodents (Lefea et al., 2015; Zhao et al., 2019). Therefore,





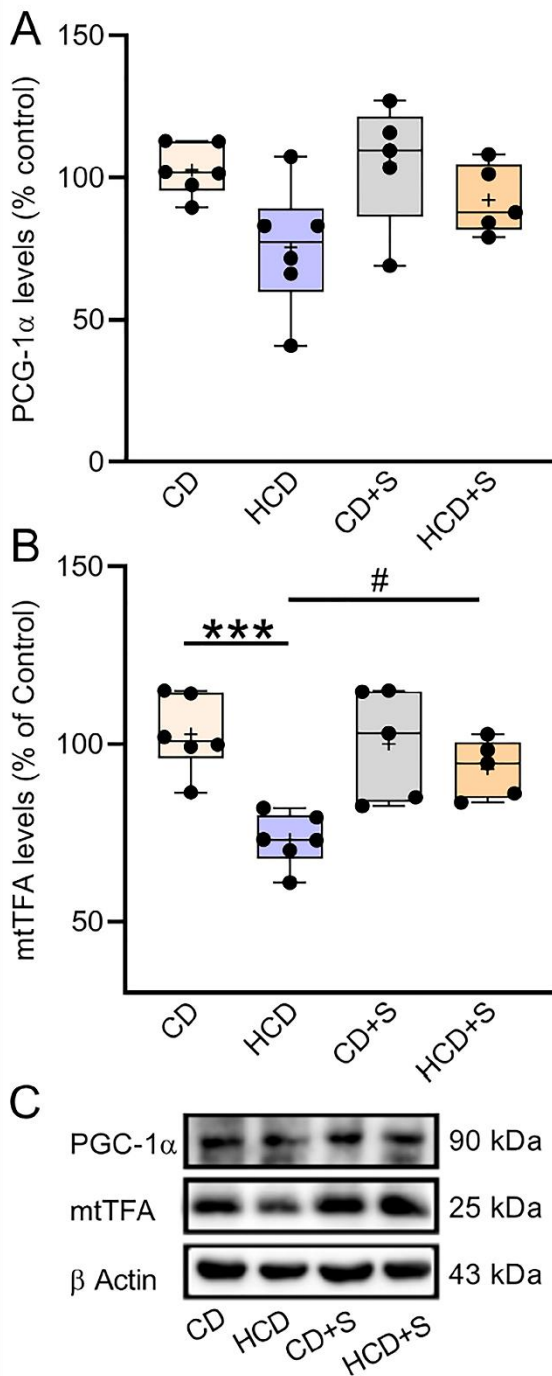
**Fig. 8.** Effects of moderate-intensity swimming protocol on (A) HO-1, (B) NRF2 levels and (C) NRF2/Keap-1 ratio in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet. (D) Representative blot bands. Data are expressed as median (25th and 75th percentiles) and analyzed through two-way ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc* test. (\*) $p < 0.05$  vs. CD group; (#) $p < 0.05$  and (##) $p < 0.01$  vs. HCD group;  $n = 5/6$  animals per group. CD – control diet, HCD – high-calorie diet, CD + S – control diet + swimming, HCD + S – high-calorie diet + swimming.

our results suggest that the period of life chosen for diet exposure was the most important fact that resulted in learning and memory impairment. Other points that should be considered to interpret the present results are the age of animals and time of diet exposure, which varies depending on each experimental protocol (Lu, 2017; Matheus et al., 2017).

The oxidative status imbalance has been related to toxicity on the brain functions, such as learning and memory (Adeniyi et al., 2016; Hedden et al., 2016). The findings of the current study indicate that the exposure to a high-calorie diet, during the early-life stage, increased lipid peroxidation (TBARS levels) and decreased the

non-antioxidant defense (NPSH levels) in the hippocampus of young mice (Fig. 10). Besides, a high-calorie diet decreased the hippocampal NRF2 levels and the NRF2/Keap-1 ratio. The NRF2/Keap-1 pathway plays a central role in cellular resistance to oxidative stress by controlling the expression of antioxidant proteins (Taguchi et al., 2011; Cuadrado et al., 2018), and phase II detoxification responses in mammals (Loboda et al., 2016).

Therefore, deregulation of the NRF2/Keap-1 complex harms the NRF2 translocation to the nucleus and posterior activation of antioxidant protein transcription, causing an imbalance on redox signaling (Ji et al., 2019). Although the transcription factor NRF2 is the major



**Fig. 9.** Effects of moderate-intensity swimming protocol on (A) PGC-1 $\alpha$  and (B) mtTFA levels in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet. (C) Representative blot bands. Data are expressed as median (25th and 75th percentiles) and analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc* test. (\*) $p < 0.05$  and (\*\*)  $p < 0.01$  vs. CD group; (#) $p < 0.05$  vs. HCD group;  $n = 5/6$  animals per group. CD – control diet, HCD – high-calorie diet, CD + S – control diet + swimming, HCD + S – high-calorie diet + swimming.

positive regulator of HO-1 transcription, a wide range of stimuli, through different mechanisms, induced the HO-1 expression (Morse et al., 2009; Li et al., 2018). HO-1 maintains the antioxidant/oxidant balance in cells (Li et al., 2018), which besides removing toxic heme, generates antioxidant molecules (Loboda et al., 2016). Moreover, the upregulation in the HO-1 gene has been reported as an antioxidant defense compensatory mechanism (Dkhil et al., 2019). Accordingly, the present findings show that exposure to a high-calorie diet in the early-life induced upregulation of the hippocampal HO-1 levels in young mice.

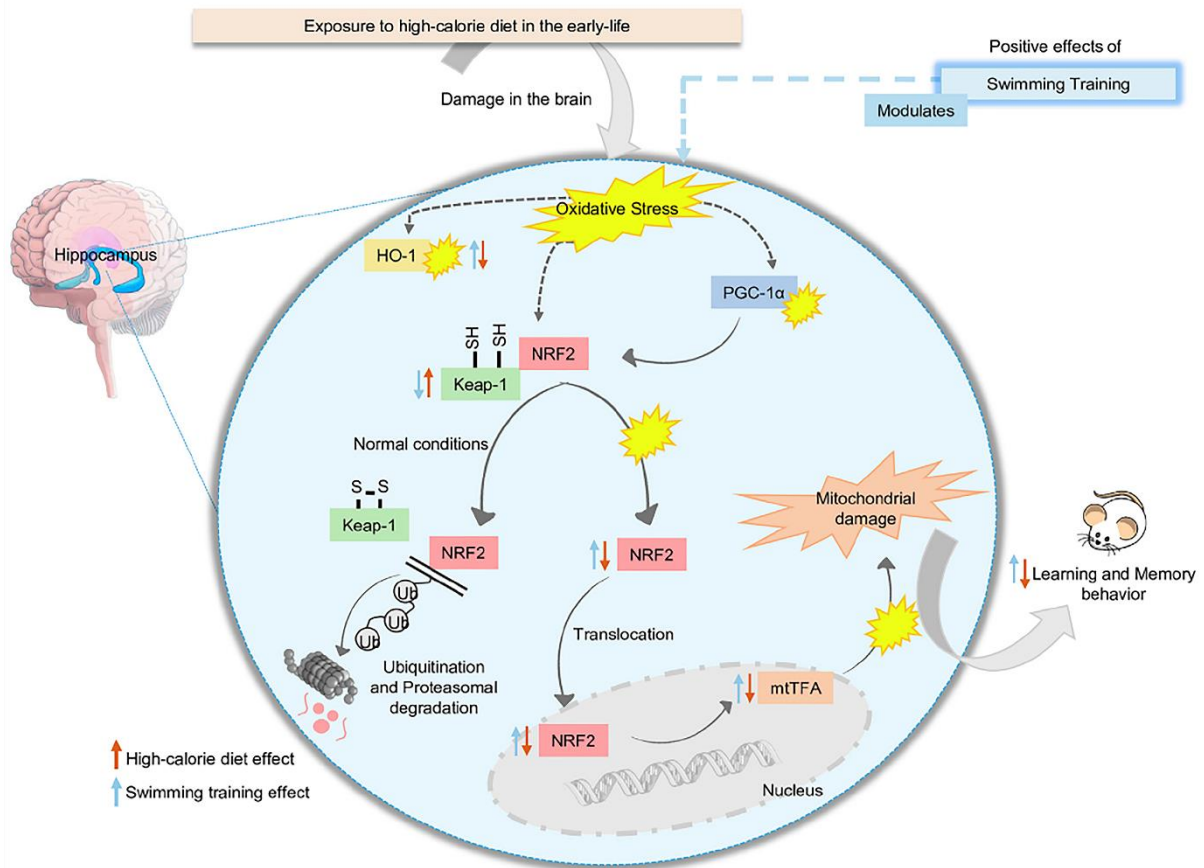
PGC-1 $\alpha$  is the preeminent regulator of mitochondrial biogenesis, participates in antioxidant gene regulation (Jornayvaz and Shulman, 2010), cooperates with nuclear respiratory factors (NRFs), including NRF2, and promotes the expression of multiple nuclear-encoded genes and the mitochondrial transcription factor A (mtTFA) (Ping et al., 2015). mtTFA is a key activator of mitochondrial transcription as well as a participant in mitochondrial genome replication (Wang et al., 2018). The consumption of a high-calorie diet in the early-life resulted in the downregulation of the hippocampal NRF2/mtTFA pathway in young mice (Fig. 10). Moreover, oxidative stress, by impairing mitochondrial biogenesis, alters the signaling of the PGC-1 $\alpha$ /NRF2/mtTFA pathway (Kim et al., 2017).

Moderate-intensity swimming training effectively protected against the increase in food intake, the fat mass deposition, spatial and short- and long-term memory impairment of young mice fed a high-calorie diet during the early-life. These results are in agreement with the previously reported neuroprotective effects of swimming in memory of rats (Faria et al., 2016; Cechella et al., 2018) and human beings (Wu et al., 2018; Antunes et al., 2019).

Moreover, swimming training improved hippocampal antioxidant status by promoting the NRF2 pathway and preventing neurodegeneration in a sporadic Alzheimer's rat model (Wu et al., 2018). Accordingly, our present results reinforce the swimming antioxidant effects, which were demonstrated by the reduction of hippocampal TBARS levels, the increase in those of NPSH, and modulating NRF2/Keap1/OH-1 pathway of young mice exposed to a high-calorie diet in the early-life. Although the neural benefits of exercise are unquestionable, little is known about the impact of aerobic exercise on PGC-1 $\alpha$ /mtTFA proteins in the hippocampus (Choi et al., 2014; Lezi et al., 2014). In the present study, moderate-intensity swimming training modulated the hippocampal mtTFA protein in young mice exposed to a high-calorie diet in the early-life.

The construct validity of forced swim protocols to model human exercise training has been a matter of debate, and in the center of this discussion is the fact that swimming involves highly adaptive and stressful behavior (Contarteze et al., 2008; Leasure and Jones, 2008). Thus, other physical activity protocols, not involving swimming, to replicate our present findings, are perspectives of future studies. We are aware and assume as a limitation of the present study the lack of a high-calorie diet-fed control group, a group calorically matched





**Fig. 10.** Summary of moderate-intensity swimming protocol effects on the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet during the early-life period. A high-calorie diet caused an increased oxidative stress status and downregulation of NRF2/Keap-1 signaling as well as altered levels of HO-1 and mtTFA in the hippocampal region of mice. Together, these alterations are related with impairment in learning and memory behaviors. Moderate-intensity swimming training evokes an adaptive response by modulation of hippocampal oxidative stress as well as upregulated the NRF2/Keap-1/HO-1 and mtTFA proteins involved in the learning and memory behavior in mice fed with a high-calorie diet.

to the high-calorie diet + swimming group. Therefore, the missing group led us to interpret the present results with caution, this because a high-calorie diet-fed control group could better clarify if concurrent swimming ameliorates memory and learning behavior in mice fed a high-calorie diet or if the swimming protocol in mice fed this diet lowers caloric intake to such an extent that memory and learning impairments never occur.

In conclusion, the present results reveal that exposure to a high-calorie diet during early-life negatively impacted learning and memory behavior in mice. Moreover, moderate-intensity swimming training, a non-pharmacological therapy, positively affected learning and memory behavior in young mice fed a high-calorie diet in the early-life. The hippocampal NRF2/Keap-1/OH-1 and mtTFA signaling pathways contribute to the swimming training effects on memory of mice fed a high-calorie diet (Fig. 10).

#### COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were

followed. This study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Santa Maria, Brazil (Permit Number: #7134140318/2017) and carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest

#### FUNDING INFORMATION/ ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Grant number 17/2551-0000), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant number 407118/2018-7), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX #23038.004173/2019-93) for the



financial support. C.W.N (#304864/2015-3) is recipient of CNPq fellowship. N.S.J (#88882.182156/2018-01) and S. G.M (#88887.372342/2019-00) are recipient of CAPES fellowships.

## REFERENCES

- Adeniyi PA, Omatsuli EP, Akinyemi AJ, Ishola AO (2016) Caffeine plus nicotine improves motor function, spatial and non-spatial working memory and functional indices in BALB/c male mice. *Pathophysiology* 23:251–258.
- Andersen SL (2003) Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neurosci Biobehav Rev* 27:3–18.
- Antunes BM, Rossi FE, Teixeira AM, Lira FS (2019) Short-time high-intensity exercise increases peripheral BDNF in a physical fitness-dependent way in healthy men. *Eur J Sport Sci*:1–8.
- Beilharz JE, Maniam J, Morris MJ (2014) Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. *Brain Behav Immun* 37:134–141.
- Belviranlı M, Okudan N (2019) Voluntary, involuntary and forced exercises almost equally reverse behavioral impairment by regulating hippocampal neurotrophic factors and oxidative stress in experimental Alzheimer's disease model. *Behav Brain Res* 364:245–255.
- Boitard C, Cavaroc A, Sauviant J, Aubert A, Castanon N, Laye S, Ferreira G (2014) Impairment of hippocampal-dependent memory induced by juvenile high-fat diet intake is associated with enhanced hippocampal inflammation in rats. *Brain Behav Immun* 40:9–17.
- Boitard C, Etchamendy N, Sauviant J, Aubert A, Tronel S, Marighetto A, Laye S, Ferreira G (2012) Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus* 22:2095–2100.
- 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.
- Cechella JL, Leite MR, Pinton S, Zeni G, Nogueira CW (2018) Neuroprotective benefits of aerobic exercise and organoselenium dietary supplementation in hippocampus of old rats. *Mol Neurobiol* 55:3832–3840.
- Chen X, Lin H, Yang D, Xu W, Liu G, Liu X, Sheng J, Huang H (2019) Early-life undernutrition reprograms CD4(+) T-cell glycolysis and epigenetics to facilitate asthma. *J Allergy Clin Immunol*.
- Cho J, Shin MK, Kim D, Lee I, Kim S, Kang H (2015) Treadmill running reverses cognitive declines due to Alzheimer disease. *Med Sci Sports Exerc* 47:1814–1824.
- Choi J, Chandrasekaran K, Demarest TG, Kristian T, Xu S, Vijaykumar K, Dsouza KG, Qi NR, Yarowsky PJ, Gallipoli R, Koch LG, Fiskum GM, Britton SL, Russell JW (2014) Brain diabetic neurodegeneration segregates with low intrinsic aerobic capacity. *Ann Clin Transl Neurol* 1:589–604.
- Contartezze RV, Machado Fde B, Gobatto CA, De Mello MA (2008) Stress biomarkers in rats submitted to swimming and treadmill running exercises. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol* 151:415–422.
- Cordner ZA, Tamashiro KL (2015) Effects of high-fat diet exposure on learning & memory. *Physiol Behav* 152:363–371.
- Cuadrado A, Manda G, Hassan A, Alcaraz MJ, Barbas C, Daiber A, Ghezzi P, Leon R, Lopez MG, Oliva B, Pajares M, Rojo AI, Robledinos-Anton N, Valverde AM, Guney E, Schmidt H (2018) Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: a systems medicine approach. *Pharmacol Rev* 70:348–383.
- Dawson CA, Nadel ER, Horvath SM (1968) Cardiac output in the cold-stressed swimming rat. *Am J Physiol* 214:320–325.
- Dkhal MA, Abdel Moneim AE, Hafez TA, Mubarak MA, Mohamed WF, Thagfan FA, Al-Quraishy S (2019) Myristica fragrans kernels prevent paracetamol-induced hepatotoxicity by inducing anti-apoptotic genes and Nrf2/HO-1 Pathway. *Int J Mol Sci*, 20.
- Dridi I, Leroy D, Guignard C, Scholl G, Bohn T, Landoulsi A, Thome JP, Eppe G, Soulimani R, Bouayed J (2014) Dietary early-life exposure to contaminated eels does not impair spatial cognitive performances in adult offspring mice as assessed in the Y-maze and the Morris water maze. *Nutr Res* 34:1075–1084.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82:70–77.
- Faria RS, Gutierrez LF, Sobrinho FC, Miranda Ido V, Reis JD, Dias EV, Sartori CR, Moreira DA (2016) Effects of the swimming exercise on the consolidation and persistence of auditory and contextual fear memory. *Neurosci Lett* 628:147–152.
- Hedden T, Schultz AP, Rieckmann A, Mormino EC, Johnson KA, Sperling RA, Buckner RL (2016) Multiple brain markers are linked to age-related variation in cognition. *Cereb Cortex* 26:1388–1400.
- Heyward FD, Walton RG, Carle MS, Coleman MA, Garvey WT, Sweatt JD (2012) Adult mice maintained on a high-fat diet exhibit object location memory deficits and reduced hippocampal SIRT1 gene expression. *Neurobiol Learn Mem* 98:25–32.
- Iqbal G, Ahmed T (2019) Co-exposure of metals and high fat diet causes aging like neuropathological changes in non-aged mice brain. *Brain Res Bull* 147:148–158.
- Izquierdo A, Brigman JL, Radke AK, Rudebeck PH, Holmes A (2017) The neural basis of reversal learning: An updated perspective. *Neuroscience* 345:12–26.
- Ji R, Sun H, Peng J, Ma X, Bao L, Fu Y, Zhang X, Luo C, Gao C, Jin Y, Sun S (2019) Rosmarinic acid exerts an antagonistic effect on vascular calcification by regulating the Nrf2 signalling pathway. *Free Radical Res*:1–11.
- Jornayvaz FR, Shulman GI (2010) Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem* 47:69–84.
- Kanoski SE, Davidson TL (2010) Different patterns of memory impairments accompany short- and longer-term maintenance on a high-energy diet. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 36:313–319.
- Kim JC, Park GD, Kim SH (2017) Inhibition of oxidative stress by antioxidant supplementation does not limit muscle mitochondrial biogenesis or endurance capacity in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 63:277–283.
- Klein CP, Hoppe JB, Saccomori AB, Dos Santos BG, Sagini JP, Crestani MS, August PM, Hozer RM, Grings M, Parmeggiani B, Leipnitz G, Navas P, Salbego CG, Matte C (2019) Physical exercise during pregnancy prevents cognitive impairment induced by amyloid-beta in adult offspring rats. *Mol Neurobiol* 56:2022–2038.
- Knott AB, Perkins G, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E (2008) Mitochondrial fragmentation in neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 9:505–518.
- Kobayashi H, Imanaka S, Nakamura H, Tsuji A (2014) Understanding the role of epigenomic, genomic and genetic alterations in the development of endometriosis (review). *Mol Med Rep* 9:1483–1505.
- Leasure JL, Jones M (2008) Forced and voluntary exercise differentially affect brain and behavior. *Neuroscience* 156:456–465.
- Leffa DD, Valvassori SS, Varela RB, Lopes-Borges J, Daumann F, Longaretti LM, Dajori AL, Quevedo J, Andrade VM (2015) Effects of palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice. *Metab Brain Dis* 30:1073–1082.
- Lezi E, Burns JM, Swerdlow RH (2014) Effect of high-intensity exercise on aged mouse brain mitochondria, neurogenesis, and inflammation. *Neurobiol Aging* 35:2574–2583.
- Li S, Fujino M, Takahara T, Li XK (2018) Protective role of heme oxygenase-1 in fatty liver ischemia-reperfusion injury. *Med Mol Morphol*.
- Liu Z, Sun Y, Qiao Q, Zhao T, Zhang W, Ren B, Liu Q, Liu X (2017) Sesamol ameliorates high-fat and high-fructose induced cognitive deficits via improving insulin signaling disruption in the central nervous system. *Food Funct* 8:710–719.
- Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, Jozkowicz A, Dulak J (2016) Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response



- and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci* 73:3221–3247.
- Loi M, Mossink JC, Meerhoff GF, Den Blaauwen JL, Lucassen PJ, Joels M (2017) Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. *Neuroscience* 342:101–119.
- Lu C (2017) Modulation of the gut microbiota by Krill oil in mice fed a high-sugar high-fat diet. *Front Microbiol* 8:905.
- Lu C, Sun T, Li Y, Zhang D, Zhou J, Su X (2017) Modulation of the gut microbiota by Krill oil in mice fed a high-sugar high-fat diet. *Front Microbiol* 8:905.
- Maliszewska-Cyna E, Xhima K, Aubert I (2016) A comparative study evaluating the impact of physical exercise on disease progression in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 53:243–257.
- Martin AA, Davidson TL (2014) Human cognitive function and the obesogenic environment. *Physiol Behav* 136:185–193.
- Matheus VA, Monteiro L, Oliveira RB, Maschio DA, Collares-Buzato CB (2017) Butyrate reduces high-fat diet-induced metabolic alterations, hepatic steatosis and pancreatic beta cell and intestinal barrier dysfunctions in prediabetic mice. *Exp Biol Med (Maywood)* 242:1214–1226.
- Mazzardo-Martins L, Martins DF, Marcon R, Dos Santos UD, Speckhann B, Gadotti VM, Sigwalt AR, Guglielmo LG, Santos AR (2010) High-intensity extended swimming exercise reduces pain-related behavior in mice: involvement of endogenous opioids and the serotonergic system. *J Pain* 11:1384–1393.
- Moir L, Bentley L, Cox RD (2016) Comprehensive energy balance measurements in mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 6:211–222.
- Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11:47–60.
- Morse D, Lin L, Choi AM, Ryter SW (2009) Heme oxygenase-1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease. *Free Radical Biol Med* 47:1–12.
- Muhsin NIA, Bentley L, Bai Y, Goldsworthy M, Cox RD (2020) A novel mutation in the mouse *Pcsk1* gene showing obesity and diabetes. *Mamm Genome* 31:17–29.
- Nakaoka K, Yamada A, Noda S, Goseki-Sone M (2019) Influence of dietary vitamin D deficiency on bone strength, body composition, and muscle in ovariectomized rats fed a high-fat diet. *Nutrition* 60:87–93.
- Noble EE, Kanoski SE (2016) Early life exposure to obesogenic diets and learning and memory dysfunction. *Curr Opin Behav Sci* 9:7–14.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351–358.
- Palomera-Avalos V, Grinan-Ferre C, Puigoriol-Illamola D, Camins A, Sanfeliu C, Canudas AM, Pallas M (2017) Resveratrol protects SAMP8 brain under metabolic stress: focus on mitochondrial function and Wnt pathway. *Mol Neurobiol* 54:1661–1676.
- Ping Z, Zhang LF, Cui YJ, Chang YM, Jiang CW, Meng ZZ, Xu P, Liu HY, Wang DY, Cao XB (2015) The protective effects of salidroside from exhaustive exercise-induced heart injury by enhancing the PGC-1 alpha -NRF1/NRF2 pathway and mitochondrial respiratory function in rats. *Oxid Med Cell Longevity* 2015 876825.
- Rosa RM, Flores DG, Appelt HR, Braga AL, Henriques JA, Roesler R (2003) Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci Lett* 341:217–220.
- Seiple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ (2013) Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 106–107:1–16.
- Spear LP (2000) The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci Biobehav Rev* 24:417–463.
- Stiles J, Jernigan TL (2010) The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* 20:327–348.
- Stranahan AM, Cutler RG, Button C, Telljohann R, Mattson MP (2011) Diet-induced elevations in serum cholesterol are associated with alterations in hippocampal lipid metabolism and increased oxidative stress. *J Neurochem* 118:611–615.
- Sun Y, Yang T, Leak RK, Chen J, Zhang F (2017) Preventive and protective roles of dietary Nrf2 activators against central nervous system diseases. *CNS Neurol Disord: Drug Targets* 16:326–338.
- Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M (2011) Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* 16:123–140.
- Takahashi E, Niimi K, Itakura C (2009) Enhanced CaMKII activity and spatial cognitive function in SAMP6 mice. *Behav Neurosci* 123:527–532.
- Vorhees CV, Williams MT (2014) Assessing spatial learning and memory in rodents. *ILAR J* 55:310–332.
- Wang X, Yang J, Lu T, Zhan Z, Wei W, Lyu X, Jiang Y, Xue X (2020) The effect of swimming exercise and diet on the hypothalamic inflammation of ApoE<sup>-/-</sup> mice based on SIRT1-NF-kappaB-GnRH expression. *Aging (Albany NY)* 12:11085–11099.
- Wang Z, Yuan S, Li Y, Zhang Z, Xiao W, Tang D, Ye K, Liu Z, Wang C, Zheng Y, Nie H, Chen H (2018) Regulation on SIRT1-PGC-1alpha/Nrf2 pathway together with selective inhibition of aldose reductase makes compound hr5F a potential agent for the treatment of diabetic complications. *Biochem Pharmacol* 150:54–63.
- Wu C, Yang L, Tucker D, Dong Y, Zhu L, Duan R, Liu TC, Zhang Q (2018) Beneficial effects of exercise pretreatment in a sporadic Alzheimer's rat model. *Med Sci Sports Exerc* 50:945–956.
- Zhao Z, Yao M, Wei L, Ge S (2019) Obesity caused by a high-fat diet regulates the Sirt1/PGC-1alpha/FNDC5/BDNF pathway to exacerbate isoflurane-induced postoperative cognitive dysfunction in older mice. *Nutr Neurosci*:1–12.

## APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2020.11.023>.

(Received 12 May 2020, Accepted 12 November 2020)  
(Available online 24 November 2020)

**Supplementary data**

**Nuclear Factor [Erythroid-derived 2]-like 2 and Mitochondrial Transcription Factor A  
Contribute to Moderate-intensity Swimming Effectiveness against Memory Impairment  
in Young Mice Induced by Concomitant Exposure to a High-calorie Diet during the  
Early Life Period**

**NEUROSCIENCE**

Natália Silva Jardim, Sabrina Grendene Müller, Flávia Matos Pase and Cristina Wayne  
Nogueira

Laboratory of Synthesis, Reactivity, Pharmacological and Toxicological Evaluation of  
Organochalcogen Compounds, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of  
Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria - RS, Brazil, Zip  
Code: 97105-900, Brazil.

\*Correspondence should be sent to:

Cristina Wayne Nogueira

E-mail: [criswn@ufsm.br](mailto:criswn@ufsm.br)

**Table S1.** Antibodies used in this study

<b>Antibody</b>	<b>Molecular Weight</b>	<b>Species</b>	<b>Dilution</b>	<b>Source</b>
mtTFA (Mitochondrial transcription factor A)	25 kDa	goat	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
HO-1 (Heme Oxygenase 1)	32 kDa	mouse	1:1000	Abcam
$\beta$ -Actin	45 kDa	mouse	1:10000	Sigma Chemicals
NRF2 (nuclear factor [erythroid-derived 2]-like 2)	61 kDa	rabbit	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Keap-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1)	69 kDa	goat	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
PGC-1 $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma-co-activator 1-alpha)	90 kDa	rabbit	1:1000	Santa Cruz Biotechnology

**Table S2.** Effect of swimming training on the body weight gain of mice exposed to a high-caloric diet.

<b>Groups</b>	<b>Body weight gain (g)</b>
CD	22.5 (20.2 - 24.5)
HCD	19.0 (19.0 - 22.0)
CD+S	20.0 (15.7 - 20.7)
HCD+S	20.5 (20.0 - 21.7)

Data were expressed as median (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentile); n = 8 animals per group. Data were analyzed through two-way ANOVA.

### 3.2 MANUSCRITO

**Disseleneto de *m*-trifluormetil difenila restaura o dano de memória, vias inflamatórias e apoptótica em hipocampo de camundongos jovens expostos a uma dieta hipercalórica**

***m*-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide restores memory impairment, hippocampal inflammatory and apoptotic pathways in young mice exposed to a high-calorie diet**

Natália Silva Jardim, Sabrina Grendene Müller, Caroline Brandão Quines, Simone Pinton e  
Cristina Wayne Nogueira

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, Brasil

\*Correspondence should be sent to:

Cristina Wayne Nogueira

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas,  
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brazil.

Phone: 55-55-3220-9611

E-mail: [criswn@ufsm.br](mailto:criswn@ufsm.br)



**Abstract**

Exposure to higher energy density and lower nutrient content diets during the early life-stages negatively influence brain development in rodents and humans. Organoselenium compounds have been reported as potential anti-inflammatory and neuroprotective agents. This study evaluated if inflammatory and apoptotic pathway's modulation contributes to the *m*-trifluoromethyl-diphenyl diselenide [ $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ ] cognitive effects in young mice exposed to a high-calorie diet. Male young Swiss mice received a high-calorie diet (20% fat; 20% carbohydrate enriched) or a control diet from 21 to 49 postnatal days. In the last week of the protocol (42 to 49 postnatal days), mice were treated with  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  (5 mg/kg/day; intragastrically) or vehicle. Mice performed the behavioral tests to assess learning and memory. The hippocampus was the brain region used to determine the protein levels of apoptotic and inflammatory pathways. The results indicated that  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  restored the increase in the fat mass and object location and recognition memory impairment in mice exposed to a high-calorie diet.  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  modulated the mitogen-activated protein kinase pathway and inflammatory, as well as pro- and anti-apoptotic protein levels in the hippocampus of young mice exposed to a high-calorie diet. In conclusion,  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  improved learning and memory-impaired in young mice fed a high-calorie diet during the early-life, modulating inflammatory and apoptotic markers.

**Keywords:** MAPKs; Early-life; Organoselenium; Brain; Diselenide

## 1. Introduction

Selenium is an essential biological trace element for humans and animals' growth and development; it is incorporated into selenoproteins with a wide range of pleiotropic effects (Rayman, 2012). This essential micronutrient has protective effects such as anti-inflammatory, antioxidant, and anti-apoptotic (Kaur et al., 2018; Küttik and Nazıroğlu, 2019; Zhang et al., 2019). Pre-clinical and clinical investigations have reported low levels of selenium's association with permanent brain injury (Pillai et al., 2014), cognitive damage (Aaseth et al., 2016), immune system functioning (Calder et al., 2020), and a lower selenium status has been reported in COVID-19 patients than in healthy ones (Majeed et al., 2021; Moghaddam et al., 2020).

Organoselenium compounds have been reported as sources of novel biologically active agents (Nogueira and Rocha, 2011), presenting anti-inflammatory, anti-apoptotic, and learning and memory enhancer in experimental models (Jardim et al., 2017; Marcondes Sari et al., 2018a; Marcondes Sari et al., 2018b). *m*-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> is a physicochemical stable (Araujo et al., 2020a) non-toxic lipophilic compound (Savegnago et al., 2009) and has pharmacological properties, such as anti-inflammatory, antioxidant, and neuroprotection (Araujo et al., 2020a; Martins et al., 2020; Rodrigues et al., 2020).

Neuroinflammation and apoptosis are common factors contributing to cognitive decline, especially hippocampus-dependent memory impairment in animal models (Razavi et al., 2016; Zhong et al., 2020b). Of particular importance, the proteins of mitogen activated protein kinase (MAPKs) pathway are known to transduce a range of extracellular signals that result in inflammatory and apoptotic responses (Gurgis et al., 2014). Regarding the action of (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>, it has been reported as a modulator of MAPKs and pro-inflammatory proteins in different animal models (Araujo et al., 2020b; Rosa et al., 2018). The activation of extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis are associated to cognitive impairment (Wang et al., 2020; Zhang et al., 2016); once activated these pathways cause an increase in the apoptotic response, and consequently brain damages (Obeng, 2020a). The high expression of pro-apoptotic proteins renders the developing brain highly sensitive to pro-apoptotic signaling (Sarosiek et al., 2017).

In addition, studies have showed that upregulation of pro-inflammatory and -apoptotic proteins affect learning and memory functions related to consumption of high fat and/or high sugar diets in rodents (Freeman et al., 2013; Kuang et al., 2014). Exposure to higher energy density and lower nutrient content diets during the early life-stages can negatively influence



brain development in rodents and humans (Semple et al., 2013). Epidemiological data have associated the prolonged exposure to high-calorie diets with an increased risk of age-related memory deficits, neurological diseases, and metabolic dysfunctions (Burchfield et al., 2018; Soares et al., 2017).

Overall, excessive calorie intake is accompanied by the deteriorating function of the central nervous system (CNS) (Burchfield et al., 2018). Overnutrition alters normal cell signaling in the brain, potentially interfering in the synaptic function and adult neurogenesis, thereby leading to impairment of cognitive functions (McLean et al., 2018). The hippocampus belongs to the limbic system and is crucial both for the consolidation of short-term memory into long-term memory and for the spatial memory that enables navigation (Squire et al., 2015). High-calorie diet intake produces cognitive deficits by impairment in the structure and function of the hippocampus (Soares et al., 2017). For all these reasons, studies focusing on novel and improved pharmacological interventions to avoid the cognitive decline related to high-calorie diet are relevant (Loera-Valencia et al., 2019).

Considering all the above mentioned, the purpose of the current study was to evaluate whether  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  counteracts learning and memory impairment in mice fed a high-calorie diet during the early-life period. This study also investigated the contribution of molecular inflammatory and apoptotic markers on the  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  effects in the young mice exposed to a high-calorie diet.

## 2. Methodology

### 2.1 Animals and diet supplementation

This study used 32 male Swiss mice (21 postnatal day - PND; initially 13 - 16 g). The animals were housed in polypropylene cages, regularly sanitized, in an appropriate room under controlled temperature ( $22 \pm 3$  °C) and humidity. They were maintained in a 12 h light/dark cycle with lights turned on at 07:00 a.m. The mice's had free access to water and a commercial diet (NuviLab CR-1®, Brazi, 2.95 kcal/g) or a high-calorie diet (4.22 kcal/g), which was prepared in our laboratory based on previously published studies (Jardim et al., 2020). Briefly, saturated fat (lard, Sadia - Brazil) and inverted sugar (corn syrup, Yoki - Brazil), 20/20 % (w/w), were added to the commercial diet to obtain the high-calorie diet (Figure 1).

All experiments were performed following the ethical principles and the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources, the Federal University of Santa Maria, Brazil (number 8990220420).

## 2.2 Organoselenium compound

(*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> (Figure 1) was synthesized as previously reported in the literature (Paulmier, 1986) and accurately characterized in our research laboratory. The <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra evaluation indicated analytical and spectroscopic data in full agreement with (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> assigned structure (data not shown). Its chemical purity (99.9%) was determined by GC/MS (Shimadzu QP2010PLUS GC/MS combination) (data not shown). The compound was dissolved in soy oil and administered in a volume 10 mL.kg<sup>-1</sup> body weight. The dose and regimen of administration were selected based on our previous studies (Müller et al., 2021).

## 2.3 Experimental design

Figure 1 illustrates the scheme of this protocol. Mice (21 PND) were distributed into four experimental groups as following: (1) *Control* - CD (fed a control diet); (2) *High-calorie diet* - HCD (fed with a high-calorie diet); (3) (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> (fed a control diet and treated with (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> - 5 mg kg<sup>-1</sup>); (4) *High-calorie diet* + (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> (fed a high-calorie diet and treated with (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> - 5 mg kg<sup>-1</sup>).

Mice, corresponding to their respective experimental groups, had free access to the diet (control or high-calorie diets) for four weeks (21 to 49 PND). PND from 21 to 49 was chosen to expose mice because this is a critical period to brain development (Semple et al., 2013). This period begins during the gestational period and continues during the early life-stages, from postnatal to youth period, in both rodents and humans (Semple et al., 2013). In the last week of the protocol (42 to 49 PND), mice intragastrically (i.g) received (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> or vehicle (soy oil). Mice's body weight was monitored daily.

At the end of the experimental protocol (PND 50), mice were subjected to the behavioral tests by performing the spontaneous locomotor profile; subsequently, the object location test (OLT - 51 PND), and object recognition tests (ORT) for short- and long-term memory (STM - 52 PND and LTM - 53 PND). All behavioral tests were performed by mice (n = 8 per experimental group), during the light of circadian cycle period, and recorded by an experimenter, using a stopwatch, and unaware of the experimental conditions. During this period, all mice received only the control diet. Lastly (54 PND), mice were euthanized, and



the hippocampus were collected, flash-frozen, and stored at - 80 °C for further *ex vivo* analysis (Western blot and immunohistochemistry; n= 5 per group). The weight of epididymal fat tissue was used to calculate the epididymal fat accumulation. Results were expressed as relative epididymal fat weight – fat (g)/body weight (g).

See more details about behavioral tests and *ex vivo* assays in the supplementary material.

## 2.4 Statistical analysis

The normality of data distribution was confirmed by the Shapiro-Wilk test (all  $p$ s > 0.05). Levene's test (all  $p$ s > 0.05) was used to assess the equality of variances across groups. The data were expressed as the mean  $\pm$  error standard of the  $n$  observation means (S.E.M). Comparisons among experimental groups were performed by a Two-way analysis of variance (ANOVA) [*Diet* x (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub>] followed by Tukey HSD *post hoc* test for multiple comparisons test. The main effects for the *high-calorie diet* or (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> were presented only when the higher (second) order interaction was non-significant. Probability values < 0.05 ( $p$  < 0.05) were considered as indicative of significance. The statistical software Statistica 10 was used.

## 3. Results

### 3.1 (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> treatment restored the increase in the fat mass in young mice exposed to a high-calorie diet

The two-way ANOVA analysis of fat mass deposition data revealed a significant difference for *high-calorie diet* x (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> interaction ( $F_{1,28} = 11.36$ ;  $p < 0.01$ ). Tukey HSD *post hoc* comparisons demonstrated an increase in the fat mass relative weight in mice exposed to a high-calorie diet compared to the control diet group (**Figure 2A**). (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> treatment reduced the fat mass relative weight of mice fed a high-calorie diet (**Figure 2A**).

Statistical analyses of the body weight data demonstrated no statistically significant difference among mice of all experimental groups.

### 3.2 (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> treatment restored learning and memory impairments induced by exposure to a high-calorie diet in young mice

The two-way ANOVA analyses of spontaneous locomotor parameters revealed a non-significant interaction [*high-calorie diet* x (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub>] (number of crossings:  $F_{1,28} = 0.00$ ,

$p = 0.93$ ; and rearings:  $F_{1,28} = 0.09$ ;  $p = 0.76$ ; distance:  $F_{1,28} = 0.02$ ,  $p = 0.88$ , and speed:  $F_{1,28} = 0.10$ ;  $p = 0.75$ ) (**Table 1**).

During the training sessions, all animals spent a similar time exploring both objects (approximately 50% of the total time) in both OLT and ORT tests (**Figure 2B**). The two-way ANOVA analysis of the localization index revealed a significant difference for *high-calorie diet*  $\times$  (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> interaction ( $F_{1,28} = 8.83$ ;  $p < 0.01$ ). *Post hoc* data showed that exposure to a high-calorie diet decreased the localization index of mice compared to the control diet group (**Figure 2C**). (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> treatment was effective against the decrease in the localization index of mice fed a high-calorie diet.

The two-way ANOVA of recognition index in the STM and LTM showed a significant difference for *high-calorie diet*  $\times$  (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> interaction (STM:  $F_{1,28} = 8.39$ ;  $p < 0.01$  and LTM:  $F_{1,28} = 5.85$ ;  $p < 0.05$ ). *Post hoc* comparisons showed that mice exposed to a high-calorie diet decreased the recognition index in STM and LTM compared to the control diet group (**Figure 2C**). (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> treatment was effective against the decrease of STM and LTM recognition indexes of mice fed a high-calorie diet.

Pearson's linear regression analyses revealed a significant negative correlation between the fat mass  $\times$  OLT ( $r = -0.79$ ;  $p < 0.001$ ); fat mass  $\times$  STM ( $r = -0.83$ ;  $p < 0.001$ ), and fat mass  $\times$  LTM ( $r = -0.66$ ;  $p < 0.001$ ) in young mice fed a high-calorie diet, suggesting the influence of high-calorie diet consumption in the learning and memory impairment (**Figure 2D**).

### 3.3 (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> treatment abolished MAPKs pathway activation in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet

The two-way ANOVA of phosphorylated MAPKs protein levels showed a significant difference for *high-calorie diet*  $\times$  (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> interaction (pERK:  $F_{1,16} = 19.07$ ;  $p < 0.001$ ; pJNK:  $F_{1,16} = 5.83$ ;  $p < 0.05$ , and pp38:  $F_{1,16} = 11.87$ ;  $p < 0.01$ ). *Post hoc* comparisons revealed an increase of hippocampal respective phosphorylated protein contents (pERK; pJNK, and pp38) induced by exposure to a high-calorie diet (**Figures 3A, 3B, and 4**).

The two-way ANOVA of MAPKs ratio showed a significant difference for *high-calorie diet*  $\times$  (*m-CF<sub>3</sub>-PhSe*)<sub>2</sub> interaction (pERK/ERK:  $F_{1,16} = 5.83$ ;  $p < 0.05$ ; pJNK/JNK:  $F_{1,16} = 6.61$ ;  $p < 0.05$ , and pp38/p38:  $F_{1,16} = 8.06$ ;  $p < 0.05$ ). *Post hoc* comparisons revealed an increase of hippocampal respective ratio of ERK; JNK, and p38 in mice exposed to a high-calorie diet (**Figures 3A, 3B, and 4**).



The quantification of total ERK, JNK, and p38 levels showed no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) among groups. The data indicate that the treatment with (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> restored the increased phosphorylated MAPKs proteins levels and the respective ratios caused by exposure to a high-calorie diet (**Figures 3A, 3B, and 4**).

3.4 (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> treatment restored the increase in hippocampal inflammatory protein levels induced by exposure to a high-calorie diet

The two-way ANOVA of COX 2, IL 1 $\beta$  and GFAP levels showed a significant difference for *high-calorie diet* x (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> interaction ( $F_{1,16} = 4.93$ ;  $p < 0.05$ ;  $F_{1,16} = 4.66$ ;  $p < 0.05$  and  $F_{1,16} = 10.86$ ;  $p < 0.01$ , respectively). *Post hoc* comparisons revealed an increase in hippocampal inflammatory protein levels in mice exposed to a high-calorie diet (**Figures 3C and 5**). (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> treatment was effective in modulated the alterations of COX 2, IL 1 $\beta$ , and GFAP levels in the hippocampus of young mice fed a high-calorie diet.

3.5 (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> treatment modulated apoptotic protein levels in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet

The two-way ANOVA of PARP levels showed a significant difference for *high-calorie diet* x (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> interaction (cleaved:  $F_{1,16} = 6.11$ ;  $p < 0.05$  and ratio:  $F_{1,16} = 7.88$ ;  $p < 0.05$ ). *Post hoc* comparisons revealed an increase of cleaved PARP levels and cleaved PARP/full-length PARP ratio in the hippocampus of mice fed a high-calorie diet (**Figure 6A**). The quantification of full-length PARP levels showed no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) among groups (**Figure 6A**). The data indicate (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> restored the increased cleaved PARP levels and cleaved PARP/full-length PARP ratio induced by a high-calorie diet.

The two-way ANOVA of Bcl2 and Bax levels showed a significant difference for *high-calorie diet* x (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> interaction (Bcl2:  $F_{1,16} = 12.60$ ;  $p < 0.01$ ; Bax:  $F_{1,16} = 25.06$ ;  $p < 0.001$ , and ratio:  $F_{1,16} = 38.22$ ;  $p < 0.01$ ). *Post hoc* comparisons revealed a decrease in the levels of Bcl-2 and an increase in those of Bax and Bax/Bcl2 ratio compared to those of the control group (**Figure 6B**). (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> treatment was effective in modulating Bcl2 and Bax levels in the hippocampus of mice fed a high-calorie diet.

#### 4. Discussion

The present study demonstrates the effectiveness of (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> in improving learning and memory impairment and restoring hippocampal apoptotic and MAPKs proteins in young mice exposed to a high-calorie diet (Figure 7).

The results indicate that fat mass increase did not lead to weight gain in mice fed a high-calorie diet, prepared by a moderate variation (20%) in fat and carbohydrate composition. Some recent findings indicate that diets containing high quantities of fat (45-60%) increase body weight (Freire-Regatillo et al., 2019), whereas refined carbohydrate enriched diets (45%) did not alter the weight gain of mice (Reis Costa et al., 2021); in common, both studies demonstrated an increase in the fat mass deposition. Besides, our results are consistent with previous studies reporting that excessive consumption of higher energy density and lower nutrient dietary leads to increased fat mass deposition (Jardim et al., 2020; Rodriguez-Correa et al., 2020; Schneider et al., 2017). The (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> effect in inducing a sustained reduction of epididymal white fat in young mice exposed to a high-calorie diet is comparable to that of *p*-chloro substituted analogue compound administered at a dose of 10 mg/kg for 7 days in rats (Bortolatto et al., 2017).

The brain health and memory function are negatively associated with increased food energy-dense intake in humans and experimental animal models (Tan and Norhaizan, 2019). The hippocampal injury is found in animals fed diets containing high fat in response to increased blood-brain barrier permeability, consequently harming learning and memory functions (Schuster et al., 2018). In this way, our results on learning and memory impairment in young mice fed a high-calorie diet are in line with previously published studies (Duffy et al., 2019; Valladolid-Acebes et al., 2013). Herein, the high-calorie diet exposure impaired recognition short- and long-term memories as well as location memory in young mice. Furthermore, our results demonstrate a negative correlation between the relative fat mass and the performance in learning and memory tests, suggesting the influence of high-calorie diet consumption in the learning and memory behavior of young mice.

The present findings also indicate that (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> restored learning and memory impairment (OLT, STM and LTM tests) in young mice fed a high-calorie diet. Regarding the (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> effects in the CNS, its antidepressant-like action in stress (Rosa et al., 2018) and energy-dense diet and ethanol intake (Müller et al., 2021) depressive models have been reported. However, only the positive effects of other diselenides, such as *p*-chloro substituted, have been reported in learning and memory impairment (Zborowski et al., 2019).



A very recent study showed that neuronal cell death and neuroinflammation play a role in cognitive impairment in animals fed a high-fat diet (Zheng et al., 2021). Other findings indicated that the obesogenic diet-induced cellular apoptosis and inflammation in mice's hypothalamus (Pang et al., 2020) and high-sucrose diet negatively impacts hippocampal function, spatial memory, and neuroinflammation during the adolescent period (Hsu et al., 2015). These findings demonstrate an association between energy-dense diets and learning and memory impairment, suggesting the potential involvement of apoptosis and inflammation pathways in driving cognitive disruption.

Neuroinflammation in the cognitive function is a crucial role of astrocytes and microglia; this occurs because astrocytes play a number of roles in supporting neurons and maintaining synaptic transmission, which is important in memory consolidation (Kwon and Koh, 2020). Besides, diets modified in the fat and sugar composition induced phosphorylation of the MAPKs pathway (Donohoe et al., 2020; Kothari et al., 2017). Our present findings indicate that high-calorie diet induced neuroinflammation as demonstrated by the activation of MAPKs signaling pathway (JNK, ERK, and p38), an increase in the inflammatory (Cox-2 and IL-1 $\beta$ ) protein levels and the astrocyte marker (GFAP) in the hippocampus of young mice. Accordingly, the GFAP expression increase has been associated with a rise in Cox-2, IL-1 $\beta$ , and other inflammatory factors in rats with memory impairment after exposure to a high-fat diet (Kang et al., 2016).

Furthermore, (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> treatment restored hippocampal inflammation by modulating MAPK activation and inflammatory protein levels in mice exposed to a high-calorie diet. Reinforcing these results, we demonstrate that increased hippocampal levels of GFAP and phosphorylate p38, as well as the qualitative staining in CA1, CA3, and DG regions, were normalized in mice treated with (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> and exposed to a high-calorie diet. The current results are in agreement with the scientific literature, although obtained in pain models, which demonstrated that acute or repeated treatment with (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> elicited an anti-inflammatory action (Araujo et al., 2020b) consistent with the reduction in the levels of pro-inflammatory cytokines, COX-2, and p38 MAPK activation (Brüning et al., 2015). Remarkably, the over-expression of p38 MAPK is mainly involved in inflammation and stress responses, but also in the cell death (Porras et al., 2004).

The Bcl-2 family proteins, both pro- and anti-apoptotic groups, are under the control of JNK and/or p38 MAPK cascades at transcriptional and/or post-transcriptional levels (Yue and López, 2020). Thus, similar to p38 MAPK, the involvement of JNK MAPK in apoptosis is also important (Obeng, 2020b). In general, the activation of JNK and p38 MAPKs



promotes apoptosis through increased expression of pro-apoptotic proteins and decreased expression of anti-apoptotic proteins (Cuenda and Rousseau, 2007; Dhanasekaran and Reddy, 2008). In the present study, we observed an increase in the pro-apoptotic (Bax and cleaved PARP) and a decrease in the anti-apoptotic (Bcl2) protein levels in the hippocampus of young mice fed a high-calorie diet. These alterations in the pro- and anti-apoptotic proteins may be related to hippocampal activation of JNK and p38 MAPKs in mice of this study. Our data also show that (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> treatment restored the apoptotic protein levels in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet.

Although the underlying mechanisms of (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> are far to be understood, this study provides evidence that modulation of the hippocampal MAPKs phosphorylation, inflammatory protein contents, and the apoptotic pathway is somewhat associated with its action in learning and memory of young mice exposed to a high-calorie diet. It is well known that the MAPK pathway is activated during the inflammatory response, and it is a potential candidate for anti-inflammatory and anti-neurodegenerative interventions (Zhong et al., 2020a).

In conclusion, the present study reveals that (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> improved learning and memory-impaired in young mice fed a high-calorie diet during the early-life, normalizing inflammatory and apoptotic markers. Considering the (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> effects already demonstrated, this organoselenium compound could raise as an alternative to treat learning and memory impairment in mice exposed to a high-calorie diet.

#### **Funding Information/Acknowledgments**

We gratefully acknowledge Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Grant number 17/2551-0000), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant number 407118/2018-7), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/PROEX #23038.004173/2019-93) for the financial support. C.W.N (#304864/2015-3) is recipient of CNPq fellowship. N.S.J (#88882.182156/2018-01) and S.G.M (#88887.372342/2019-00) are recipient of CAPES fellowships.

#### **Compliance with Ethical Standards**

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. This study was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Federal University of Santa Maria, Brazil (Permit Number:



#8990220420/2020) and carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health.

### **Declaration of competing interest**

The authors declare no conflict of interest

### **5. References**

- Aaseth, J., Alexander, J., Bjørklund, G., Hestad, K., Dusek, P., Roos, P.M., Alehagen, U., 2016. Treatment strategies in Alzheimer's disease: a review with focus on selenium supplementation. *BioMetals* 29, 827-839.
- Araujo, P.C.O., Sari, M.H.M., Jardim, N.S., Jung, J.T.K., Brüning, C.A., 2020a. Effect of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide on acute and subchronic animal models of inflammatory pain: Behavioral, biochemical and molecular insights. *Chem Biol Interact* 317, 108941.
- Araujo, P.C.O., Sari, M.H.M., Jardim, N.S., Jung, J.T.K., Brüning, C.A., 2020b. Effect of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide on acute and subchronic animal models of inflammatory pain: Behavioral, biochemical and molecular insights. *Chemico-Biological Interactions* 317, 108941.
- Bortolotto, C.F., Nogueira, C.W., Porteiro, B., Imbernón, M., Nogueiras, R., 2017. Hypothalamic pathways regulate the anorectic action of p-chloro-diphenyl diselenide in rats. *European Journal of Pharmacology* 815, 241-250.
- Brüning, C.A., Martini, F., Soares, S.M., Sampaio, T.B., Gai, B.M., Duarte, M.M.M.F., Nogueira, C.W., 2015. 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 and Biological Psychiatry* 63, 35-46.
- Burchfield, J.G., Kebede, M.A., Meoli, C.C., Stöckli, J., Whitworth, P.T., Wright, A.L., Hoffman, N.J., Minard, A.Y., Ma, X., Krycer, J.R., Nelson, M.E., Tan, S.-X., Yau, B., Thomas, K.C., Wee, N.K.Y., Khor, E.-C., Enriquez, R.F., Vissel, B., Biden, T.J., Baldock, P.A., Hoehn, K.L., Cantley, J., Cooney, G.J., James, D.E., Fazakerley, D.J., 2018. High dietary fat and sucrose result in an extensive and time-dependent deterioration in health of multiple physiological systems in mice. *Journal of Biological Chemistry* 293, 5731-5745.
- Calder, P.C., Carr, A.C., Gombart, A.F., Eggersdorfer, M., 2020. Optimal Nutritional Status for a Well-Functioning Immune System Is an Important Factor to Protect against Viral Infections. *Nutrients* 12, 1181.
- Cuenda, A., Rousseau, S., 2007. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773, 1358-1375.
- Dhanasekaran, D.N., Reddy, E.P., 2008. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene* 27, 6245-6251.
- Donohoe, F., Wilkinson, M., Baxter, E., Brennan, D.J., 2020. Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) and Obesity-Related Cancer. *Int J Mol Sci* 21.
- Duffy, C.M., Hofmeister, J.J., Nixon, J.P., Butterick, T.A., 2019. High fat diet increases cognitive decline and neuroinflammation in a model of orexin loss. *Neurobiol Learn Mem* 157, 41-47.
- Freeman, L.R., Haley-Zitlin, V., Rosenberger, D.S., Granholm, A.-C., 2013. Damaging effects of a high-fat diet to the brain and cognition: A review of proposed mechanisms. *Nutritional Neuroscience* 17, 241-251.
- Freire-Regatillo, A., Fernández-Gómez, M.J., Díaz, F., Barrios, V., Sánchez-Jabonero, I., Frago, L.M., Argente, J., García-Segura, L.M., Chowen, J.A., 2019. Sex differences in the peripubertal response to a short-term, high-fat diet intake. *Journal of Neuroendocrinology* 32.



- Gurgis, F.M.S., Ziaziaris, W., Munoz, L., 2014. Mitogen-Activated Protein Kinase–Activated Protein Kinase 2 in Neuroinflammation, Heat Shock Protein 27 Phosphorylation, and Cell Cycle: Role and Targeting. *Molecular Pharmacology* 85, 345-356.
- Hsu, T.M., Konanur, V.R., Taing, L., Usui, R., Kayser, B.D., Goran, M.I., Kanoski, S.E., 2015. Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats. *Hippocampus* 25, 227-239.
- Jardim, N.S., Muller, S.G., Pase, F.M., Nogueira, C.W., 2020. Nuclear Factor [Erythroid-derived 2]-like 2 and Mitochondrial Transcription Factor A Contribute to Moderate-intensity Swimming Effectiveness against Memory Impairment in Young Mice Induced by Concomitant Exposure to a High-calorie Diet during the Early Life Period. *Neuroscience*.
- Jardim, N.S., Sartori, G., Sari, M.H.M., Muller, S.G., Nogueira, C.W., 2017. Bisphenol A impairs the memory function and glutamatergic homeostasis in a sex-dependent manner in mice: Beneficial effects of diphenyl diselenide. *Toxicol Appl Pharmacol* 329, 75-84.
- Kang, E.B., Koo, J.H., Jang, Y.C., Yang, C.H., Lee, Y., Cosio-Lima, L.M., Cho, J.Y., 2016. Neuroprotective Effects of Endurance Exercise Against High-Fat Diet-Induced Hippocampal Neuroinflammation. *Journal of Neuroendocrinology* 28.
- Kaur, R., Ghanghas, P., Rastogi, P., Kaushal, N., 2018. Protective Role of Selenium Against Hemolytic Anemia Is Mediated Through Redox Modulation. *Biological Trace Element Research* 189, 490-500.
- Kothari, V., Luo, Y., Tornabene, T., O'Neill, A.M., Greene, M.W., Geetha, T., Babu, J.R., 2017. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863, 499-508.
- Kuang, H., Sun, M., Lv, J., Li, J., Wu, C., Chen, N., Bo, L., Wei, X., Gu, X., Liu, Z., Mao, C., Xu, Z., 2014. Hippocampal apoptosis involved in learning deficits in the offspring exposed to maternal high sucrose diets. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25, 985-990.
- Kütük, S.G., Nazıroğlu, M., 2019. Selenium Diminishes Docetaxel-Induced Cell Death, Oxidative Stress, and Inflammation in the Laryngotracheal Epithelium of the Mouse. *Biological Trace Element Research* 196, 184-194.
- Kwon, H.S., Koh, S.H., 2020. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. *Transl Neurodegener* 9, 42.
- Loera-Valencia, R., Goikolea, J., Parrado-Fernandez, C., Merino-Serrais, P., Maioli, S., 2019. Alterations in cholesterol metabolism as a risk factor for developing Alzheimer's disease: Potential novel targets for treatment. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 190, 104-114.
- Majeed, M., Nagabhushanam, K., Gowda, S., Mundkur, L., 2021. An exploratory study of selenium status in healthy individuals and in patients with COVID-19 in a south Indian population: The case for adequate selenium status. *Nutrition* 82, 111053.
- Marcondes Sari, M.H., Zborowski, V.A., Ferreira, L.M., Jardim, N.d.S., Araujo, P.C.O., Brüning, C.A., Cruz, L., Nogueira, C.W., 2018a. Enhanced pharmacological actions of p,p'-methoxyl-diphenyl diselenide-loaded polymeric nanocapsules in a mouse model of neuropathic pain: Behavioral and molecular insights. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 46, 17-25.
- Marcondes Sari, M.H., Zborowski, V.A., Ferreira, L.M., Jardim, N.S., Barbieri, A.V., Cruz, L., Nogueira, C.W., 2018b. p,p'-Methoxyl-diphenyl diselenide-loaded polymeric nanocapsules as a novel approach to inflammatory pain treatment: Behavioral, biochemistry and molecular evidence. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 111, 38-45.
- Martins, C.C., Rosa, S.G., Recchi, A.M.S., Nogueira, C.W., Zeni, G., 2020. m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide (m-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> modulates the hippocampal neurotoxic adaptations and abolishes a depressive-like phenotype in a short-term morphine withdrawal in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 98, 109803.
- McLean, F.H., Grant, C., Morris, A.C., Horgan, G.W., Polanski, A.J., Allan, K., Campbell, F.M., Langston, R.F., Williams, L.M., 2018. Rapid and reversible impairment of episodic memory by a high-fat diet in mice. *Scientific Reports* 8.

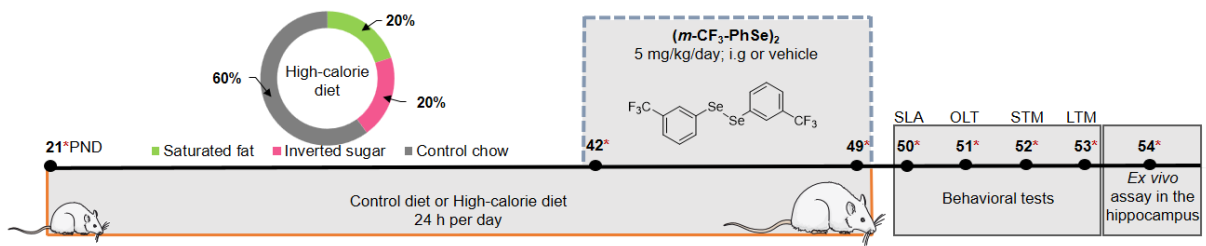


- Moghaddam, A., Heller, R.A., Sun, Q., Seelig, J., Cherkezov, A., Seibert, L., Hackler, J., Seemann, P., Diegmann, J., Pilz, M., Bachmann, M., Minich, W.B., Schomburg, L., 2020. Selenium Deficiency Is Associated with Mortality Risk from COVID-19. *Nutrients* 12, 2098.
- Müller, S.G., Jardim, N.S., Trindade, M.A., Nogueira, C.W., 2021. Opioid System Contributes to the Trifluoromethyl-Substituted Diselenide Effectiveness in a Lifestyle-Induced Depression Mouse Model. *Molecular Neurobiology*.
- Nogueira, C.W., Rocha, J.B., 2011. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. *Arch Toxicol* 85, 1313-1359.
- Obeng, E., 2020a. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Brazilian Journal of Biology*.
- Obeng, E., 2020b. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Braz J Biol*.
- Pang, D., Yang, C., Luo, Q., Li, C., Liu, W., Li, L., Zou, Y., Feng, B., Chen, Z., Huang, C., 2020. Soy isoflavones improve the oxidative stress induced hypothalamic inflammation and apoptosis in high fat diet-induced obese male mice through PGC1- $\alpha$  pathway. *Aging* 12, 8710-8727.
- Paulmier, C., 1986. Selenoorganic functional groups. In: Paulmier, C. (Eds.), *Selenium. Reagents and Intermediates in Organic Synthesis*, England, . 25-51.
- Pillai, R., Uyehara-Lock, J.H., Bellinger, F.P., 2014. Selenium and selenoprotein function in brain disorders. *IUBMB Life* 66, 229-239.
- Porrás, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A.M., Ambrosino, C., Benito, M., Nebreda, A.R., 2004. p38  $\alpha$  mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol Biol Cell* 15, 922-933.
- Rayman, M.P., 2012. Selenium and human health. *The Lancet* 379, 1256-1268.
- Razavi, S., Sadeghi, A., Hami, J., Esfandiary, E., Hejazi, Z., 2016. The effect of diabetes mellitus on apoptosis in hippocampus: Cellular and molecular aspects. *International Journal of Preventive Medicine* 7, 57.
- Reis Costa, D.E.F.d., Silveira, A.L.M., Campos, G.P., Nóbrega, N.R.C., de Araújo, N.F., de Figueiredo Borges, L., dos Santos Aggum Capettini, L., Ferreira, A.V.M., Bonaventura, D., 2021. High-Carbohydrate Diet Enhanced the Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue Through Activation of Renin-Angiotensin System. *Frontiers in Physiology* 11.
- Rodrigues, R.F., Martins, C.C., Rosa, S., Nogueira, C.W., 2020. CF3-substituted diselenide modulatory effects on oxidative stress, induced by single and repeated morphine administrations, in susceptible tissues of mice. *Can J Physiol Pharmacol*.
- Rodriguez-Correa, E., Gonzalez-Perez, I., Clavel-Perez, P.I., Contreras-Vargas, Y., Carvajal, K., 2020. Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? *Nutr Diabetes* 10, 24.
- Rosa, S.G., Pesarico, A.P., Nogueira, C.W., 2018. m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide promotes resilience to social avoidance induced by social defeat stress in mice: Contribution of opioid receptors and MAPKs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 82, 123-135.
- Sarosiek, K.A., Fraser, C., Muthalagu, N., Bhola, P.D., Chang, W., McBrayer, S.K., Cantlon, A., Fisch, S., Golomb-Mello, G., Ryan, J.A., Deng, J., Jian, B., Corbett, C., Goldenberg, M., Madsen, J.R., Liao, R., Walsh, D., Sedivy, J., Murphy, D.J., Carrasco, D.R., Robinson, S., Moslehi, J., Letai, A., 2017. Developmental Regulation of Mitochondrial Apoptosis by c-Myc Governs Age- and Tissue-Specific Sensitivity to Cancer Therapeutics. *Cancer Cell* 31, 142-156.
- Savegnago, L., Jesse, C.R., Nogueira, C.W., 2009. Structural modifications into diphenyl diselenide molecule do not cause toxicity in mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 27, 271-276.
- Schneider, B.C., Dumith, S.C., Orlandi, S.P., Assuncao, M.C.F., 2017. Diet and body fat in adolescence and early adulthood: a systematic review of longitudinal studies. *Cien Saude Colet* 22, 1539-1552.
- Schuster, F., Huber, G., Stolting, I., Wing, E.E., Saar, K., Hubner, N., Banks, W.A., Raasch, W., 2018. Telmisartan prevents diet-induced obesity and preserves leptin transport across the blood-brain barrier in high-fat diet-fed mice. *Pflugers Arch* 470, 1673-1689.



- Semple, B.D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D.M., Noble-Haeusslein, L.J., 2013. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 106-107, 1-16.
- Soares, M.B., Ramalho, J.B., Izaguirry, A.P., Pavin, N.F., Spiazzi, C.C., Schimidt, H.L., Mello-Carpes, P.B., Santos, F.W., 2017. Comparative effect of *Camellia sinensis* teas on object recognition test deficit and metabolic changes induced by cafeteria diet. *Nutritional Neuroscience* 22, 531-540.
- Squire, L.R., Genzel, L., Wixted, J.T., Morris, R.G., 2015. Memory consolidation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a021766.
- Tan, B.L., Norhaizan, M.E., 2019. Effect of High-Fat Diets on Oxidative Stress, Cellular Inflammatory Response and Cognitive Function. *Nutrients* 11.
- Valladolid-Acebes, I., Fole, A., Martin, M., Morales, L., Cano, M.V., Ruiz-Gayo, M., Del Olmo, N., 2013. Spatial memory impairment and changes in hippocampal morphology are triggered by high-fat diets in adolescent mice. Is there a role of leptin? *Neurobiol Learn Mem* 106, 18-25.
- Wang, X., Hu, X., Zhang, L., Xu, X., Sakurai, T., 2020. Nicotinamide mononucleotide administration after severe hypoglycemia improves neuronal survival and cognitive function in rats. *Brain Research Bulletin* 160, 98-106.
- Yue, J., López, J.M., 2020. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 2346.
- Zborowski, V.A., Heck, S.O., Sari, M.H.M., Bastos, N.K., Neto, J.S.S., Nogueira, C.W., 2019. (p-CIPhSe)<sub>2</sub> modulates hippocampal BDNF/TrkB signaling and reverses memory impairment induced by diabetes in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 94, 109660.
- Zhang, Y., Li, D., Li, H., Hou, D., Hou, J., 2016. Taurine Pretreatment Prevents Isoflurane-Induced Cognitive Impairment by Inhibiting ER Stress-Mediated Activation of Apoptosis Pathways in the Hippocampus in Aged Rats. *Neurochemical Research* 41, 2517-2525.
- Zhang, Z.-b., Guo, Y.-f., Li, C.-y., Qiu, C.-w., Guo, M.-y., 2019. Selenium influences mmu-miR-155 to inhibit inflammation in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis in mice. *Food & Function* 10, 6543-6555.
- Zheng, Y., Zhang, J., Zhao, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Guan, J., Liu, Y., Fu, J., 2021. Curcumin protects against cognitive impairments in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion combined with diabetes mellitus by suppressing neuroinflammation, apoptosis, and pyroptosis. *International Immunopharmacology* 93, 107422.
- Zhong, J., Wang, Z., Xie, Q., Li, T., Chen, K., Zhu, T., Tang, Q., Shen, C., Zhu, J., 2020a. Shikonin ameliorates D-galactose-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice via the MAPK and nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Int Immunopharmacol* 83, 106491.
- Zhong, J., Wang, Z., Xie, Q., Li, T., Chen, K., Zhu, T., Tang, Q., Shen, C., Zhu, J., 2020b. Shikonin ameliorates D-galactose-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice via the MAPK and nuclear factor-κB signaling pathway. *International Immunopharmacology* 83, 106491.

## TABLES, FIGURES E LEGENDS

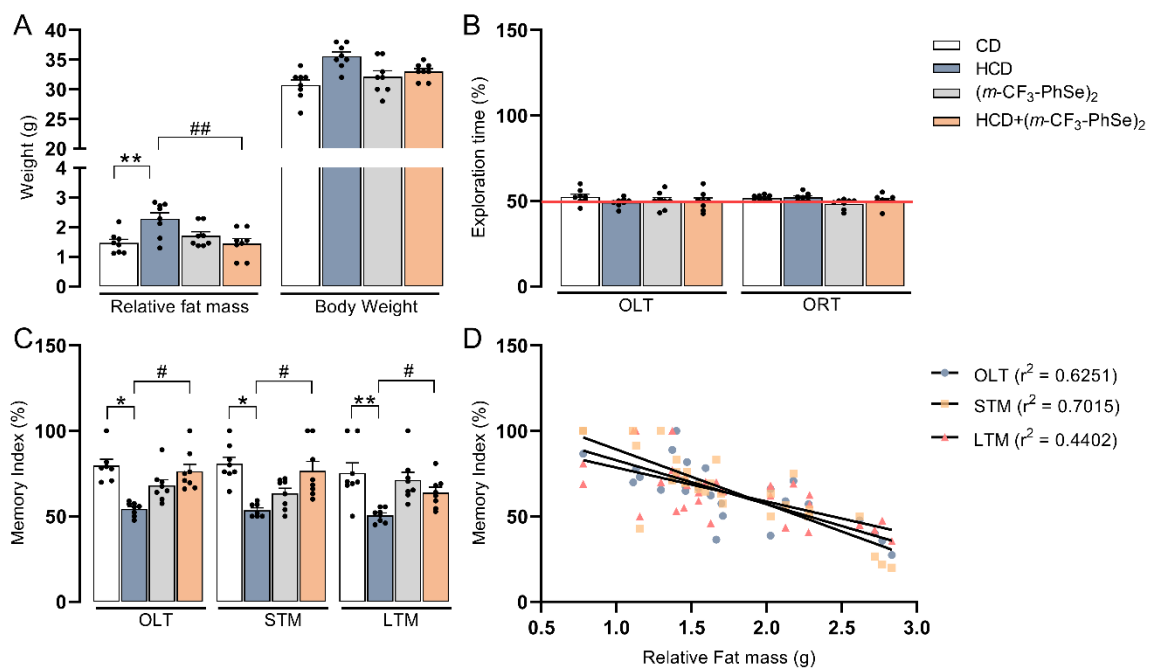


**Figure 1.** Schematic representation of this study. Male mice were exposed to a high-calorie (containing 20% saturated fat and 20% inverted sugar) or control diet from PND 21 to 49. At the last week (PND 42 to 49), the mice were intragastrically treated with  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  at a dose of 5 mg/kg once a day. The behavioral tests were carried out from PND 50 to 53. PND: postnatal day; SLA: Spontaneous Locomotor Activity; OLT: object location test; STM: short-term memory, and LTM: long-term memory tests.

**Table 1.** Effects of  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  on spontaneous locomotor parameters of mice exposed to a high-calorie diet.

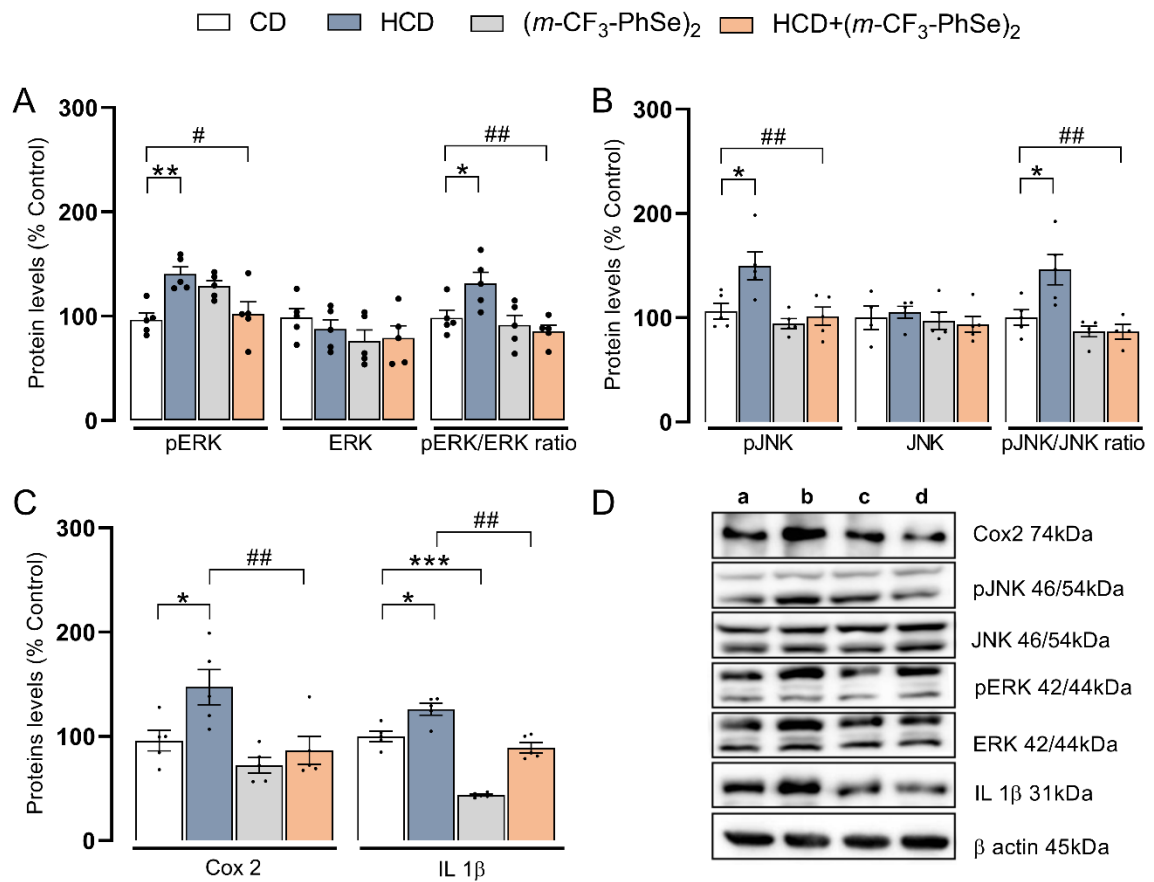
Groups	Spontaneous locomotor profile			
	Crossings (n)	Rearings (n)	Distance (m)	Speed (mm/s)
CD	723 ± 104	20.8 ± 2.8	12.2 ± 1.6	47.7 ± 5.7
HCD	826 ± 73	21.1 ± 2.4	12.8 ± 1.1	53.5 ± 4.4
$(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$	807 ± 50	21.0 ± 2.1	12.3 ± 0.9	51.4 ± 4.5
HCD+ $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$	924 ± 102	23.0 ± 2.9	12.3 ± 1.9	52.7 ± 7.7

Data are expressed as the mean ± SEM and analyzed by two-way ANOVA; n = 8 animals per group. Data are expressed as (n) number of rearings or crossings; (m) meters, and (mm/s): millimeters per second. CD - control diet group; HCD - high-calorie diet group

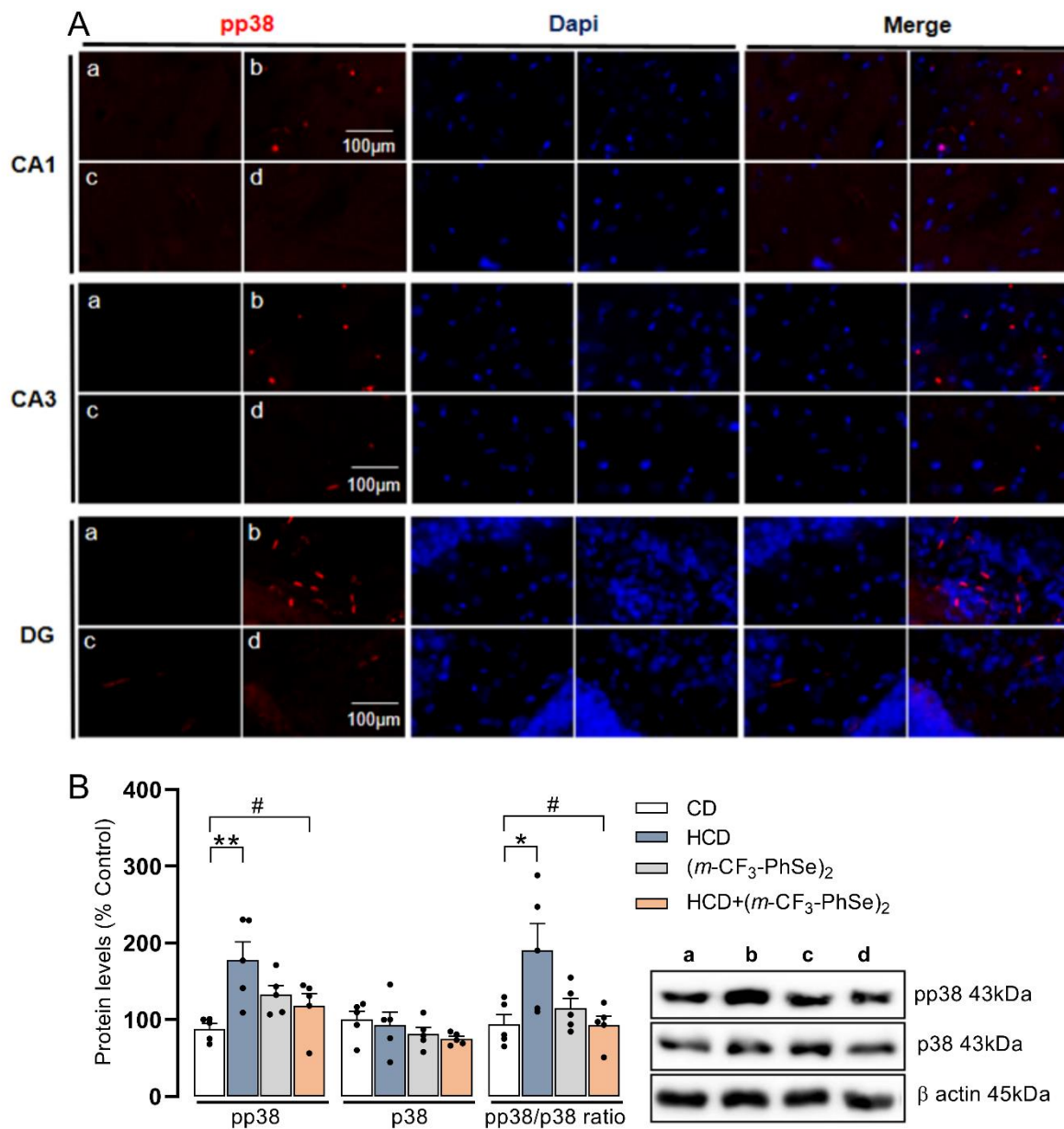


**Figure 2.** Effects of  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  on the relative epididymal fat mass, body weight, and memory performance of mice exposed to a high-calorie diet. (A) Relative epididymal fat mass and body weight, (B) Training sessions (OLT and ORT), (C) OLT (2h after training), STM (1.5 h after training), and LTM (24 h after training), (D) Memory indexes and relative fat mass correlation (Pearson's correlation coefficient). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc* test. (\*)  $p < 0.05$  and (\*\*)  $p < 0.01$  vs CD group; (#)  $p < 0.05$  and (##)  $p < 0.01$  vs HCD group;  $n = 8$  animals per group. OLT -object location test, ORT - object recognition test, STM- short-term memory, and LTM-long-term memory. CD - control diet group; HCD - high-calorie diet group

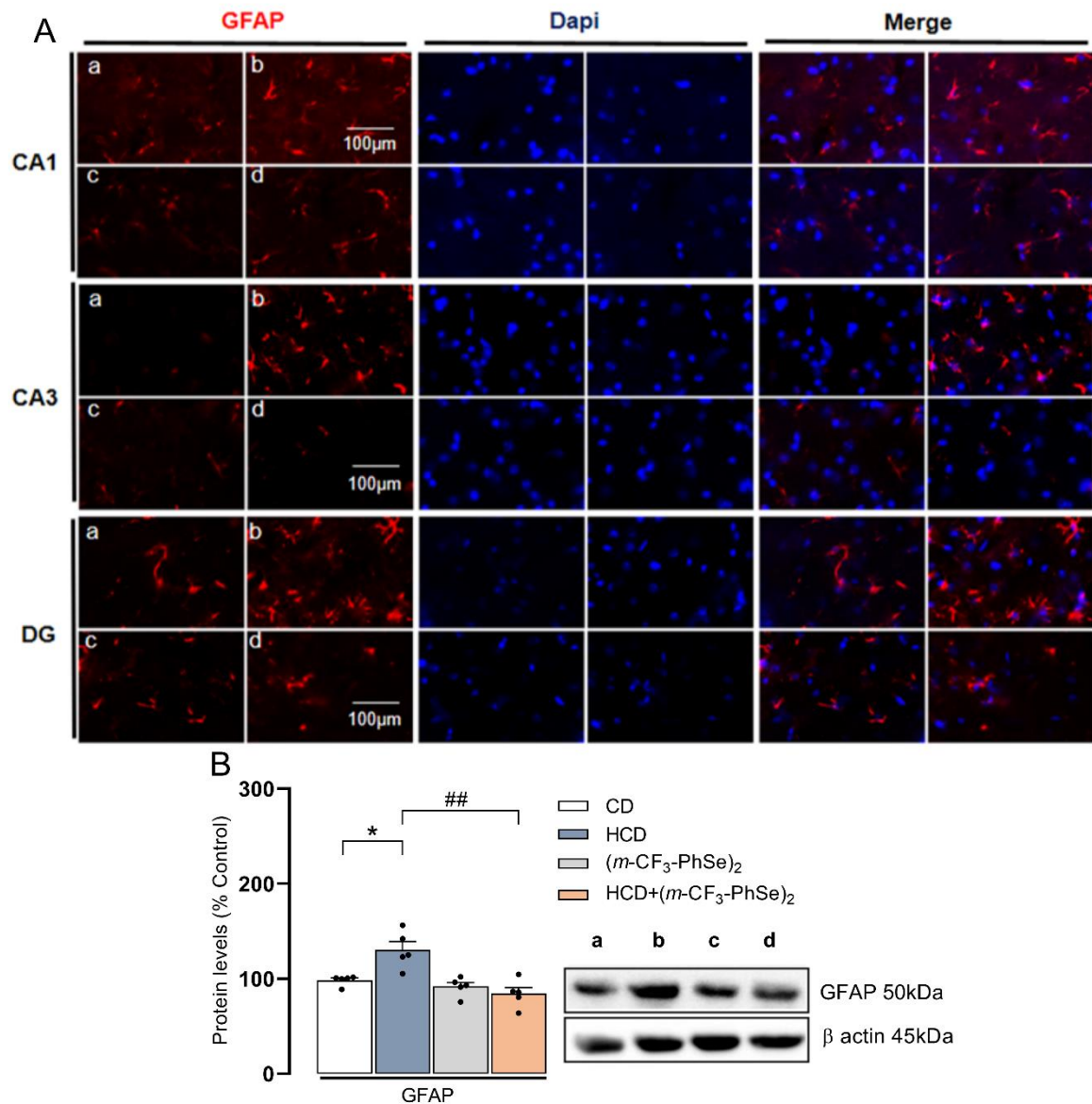




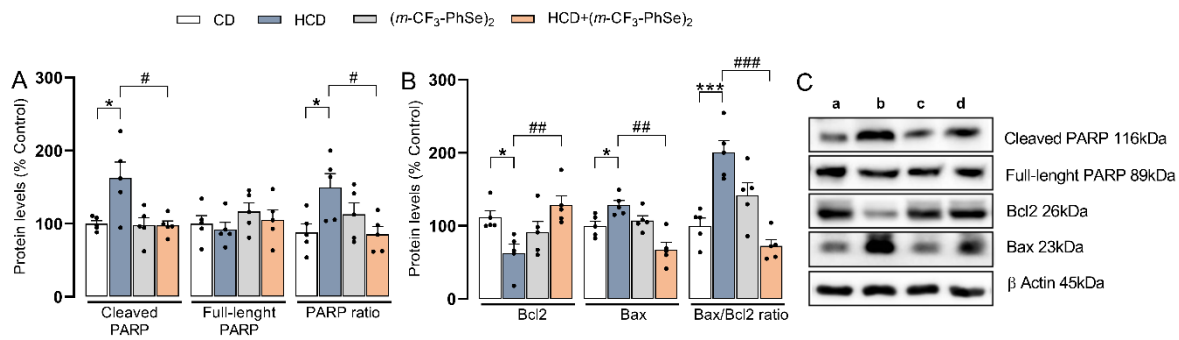
**Figure 3.** Effects of  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  on the inflammatory protein levels in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet. (A) pERK, ERK, and their ratio. (B) pJNK; JNK, and their ratio, (C) Cox2 and IL 1 $\beta$ . (D) images of representative bands (a: CD; b: HCD; c:  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  and d: HCD+ $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ ). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc* test. (\*)  $p < 0.05$ , (\*\*)  $p < 0.01$  and (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. CD group; (#)  $p < 0.05$  and (##)  $p < 0.01$  vs. HCD group;  $n = 5$  animals per group. CD - control diet group; HCD - high-calorie diet group



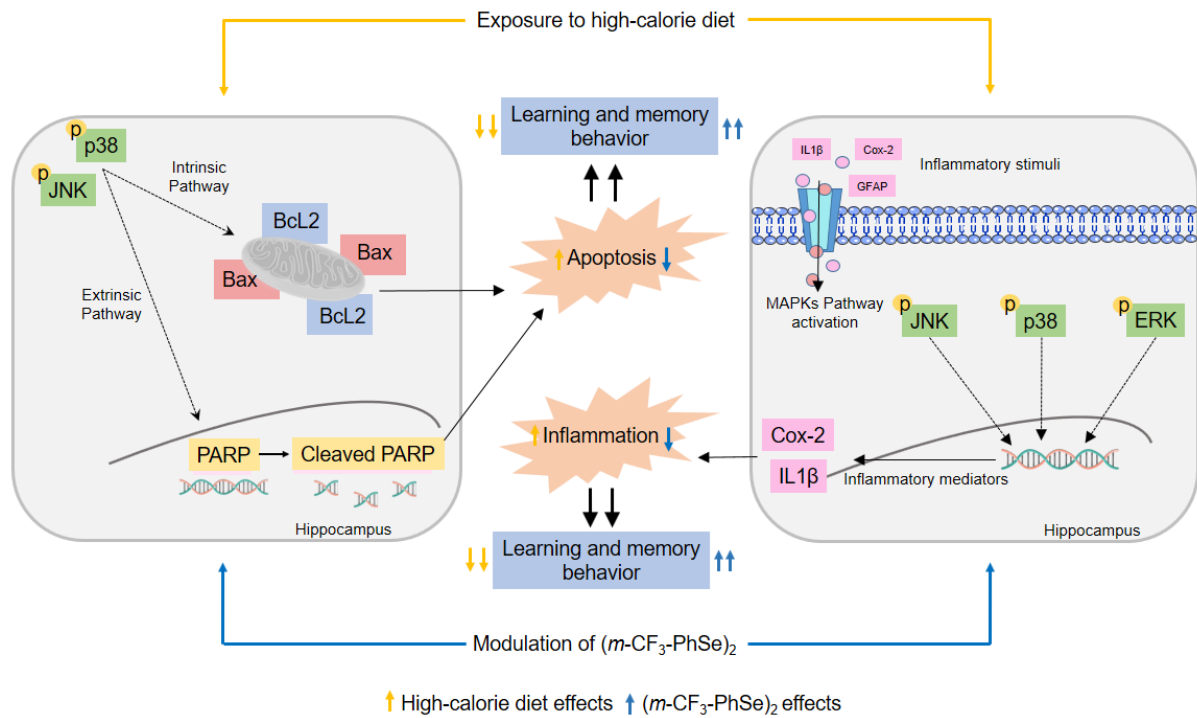
**Figure 4.** Effects of (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> on the p38 in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet. (A) Representative immunofluorescent staining photo of phosphorylated p38 protein (red) in the CA1, CA3, and dentate gyrus (DG) regions of hippocampus (scale bar 100 μm). (B) pp38, p38, and their ratio. (C) images of representative bands (a: CD; b: HCD; c: (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> and d: HCD+(*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>). Data are expressed as the mean ± SEM and analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc* test. (\*) p < 0.05 and (\*\*) p < 0.01 vs. CD group; (#) p < 0.05; n = 5 animals per group. CD - control diet group; HCD - high-calorie diet group



**Figure 5.** Effects of (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> on the GFAP in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet. (A) Representative immunofluorescent staining photo of GFAP (red) in the CA1, CA3, and dentate gyrus (DG) regions of hippocampus (scale bar 100 μm). (B) Levels of pp38, p38, and their ratio. (C) images of representative bands (a: CD; b: HCD; c: (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> and d: HCD+(*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>). Data are expressed as the mean ± SEM and analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc* test. (\*) *p* < 0.05 vs. CD group; (##) *p* < 0.01; *n* = 5 animals per group. CD - control diet group; HCD - high-calorie diet group



**Figure 6.** Effects of  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  on the apoptotic protein levels in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet. (A) cleaved PARP, full-length PARP, and their ratio, (B) Bcl2, Bax, and their ratio, and (C) images of representative bands (a: CD; b: HCD; c:  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ , and d: HCD+ $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ ). Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM and analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc* test. (\*)  $p < 0.05$  and (\*\*\*)  $p < 0.001$  vs. CD group; (#)  $p < 0.05$ , (##)  $p < 0.01$ , and (###)  $p < 0.001$  vs HCD group;  $n = 5$  animals per group. CD - control diet group; HCD - high-calorie diet group.



**Figure 7.** Summary of  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  effects on the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet during the early-life period (blue arrows). Proteins from the intrinsic and extrinsic apoptotic, MAPKs, and inflammatory pathways were altered in the hippocampus of mice exposed to a high-calorie diet during the early-life period (yellow arrows).  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  evoked an adaptive response by modulating hippocampal apoptotic and inflammatory proteins which were associated with improvement of learning and memory in mice exposed to a high-calorie diet.



## Supplementary data

### Behavioral studies

#### *Locomotor profile*

The mice performed the behavior test in a clear acrylic plastic box (50 cm × 48 cm × 50 cm) connected to a monitor with photocell beams and, equipped with 16 infrared sensors for the automatic recording of general locomotor activity and the animal position (Insight<sup>®</sup> Monitor Activity System, Ribeirao Preto, SP, Brazil). Each animal was placed in the center of the apparatus to explore the arena for 4 min freely. Parameters of spontaneous locomotion, such as the numbers of crossings, rearings, speed, and total distance, were evaluated to discard non-specific effects (York et al., 2013) caused by exposure to a high-calorie diet in mice.

#### *Object location and recognition tests*

The object localization index for each mouse in the OLT was calculated and expressed by the formula:  $[TA1' / (TA1 + TA1')] * 100$ . [TA1 = time spent exploring the object in the familiar location A1; TA1' = time spent exploring the object in a novel location A1'].

The object recognition index for each mouse in the ORT was calculated and expressed by the formula: [the time spent exploring the novel object divided by total exploration time \* 100]; [STM =  $(B / (A1 + B)) * 100$ ; LTM =  $(C / (A1 + C)) * 100$ ].

#### **The OLT:**

The OLT test is based on the rodents' spontaneous tendency to spend more time exploring a novel object than a familiar one and recognizing when an object has been relocated (Blaser and Heyser, 2015). The OLT was performed according to Takahashi et al. (2009), with modifications. This test was carried out in an open-field arena in which mice were previously habituated (10 min). There were no objects during the habituation session, and the mice were left to explore the open-field freely. Twenty-four h after, the mice underwent a training session, which consisted of 5 min of arena exploration with two identical objects (duple Lego toys), positioned one (A1) parallel to the other (A1'). After 2 h, the behavioral test was performed by moving an object (A1'; object in a novel location) to a novel place that was diagonally opposite to object A1 (object in the familiar location).

**The ORT:**

The ORT was carried out to analyze the short- and long- term memory (Rosa et al., 2003) in mice exposed to a saturated fat/inverted sugar during the early-life period. Firstly, the mice were subjected to a training session: 5 min of arena exploration with two identical objects (duple Lego toys). For the test session, we replaced one object with a novel one and analyzed the mouse interaction with the objects for 5 min, for short- (STM) or long-term memory (LTM). The STM test was performed 1.5 h after training; the mice explored the open field in the presence of one familiar (A1) and a novel object (B). The LTM test was conducted 24 h after the training session; the same mouse explored the field in the presence of a familiar object (A1) and a novel object (C). A percentage of the total time that the mice spent exploring the novel object was defined as the recognition memory measure.

*Ex vivo* assays

## Western blot analysis

The hippocampus samples (n= 5 per group) were homogenized in ice-cold RIPA lysis buffer containing proteases and phosphatases inhibitor cocktail. The final protein concentration in each sample was adjusted to 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  with a sample buffer containing Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, glycerol, 10% sodium dodecyl sulfate [SDS], 2-mercaptoethanol, and bromophenol blue. The protein concentration was measured using the Bicinchoninic acid Kit (BCA assay). The samples (30  $\mu\text{g}$  of protein) and pre-stained molecular weight standards were separated on 10% at 12% SDS-PAGE electrophoresis gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membrane (0.45  $\mu\text{m}$ , Bio-rad) using Transfer-Blot® Turbo™ Transfer System (1.0A; 45 min) and blocked with 5% milk solution. Ponceau S staining confirmed the protein loading. The blots were incubated overnight at 4°C with primary antibody (Table S1). After, membranes were washed and incubated with the respective secondary antibody, which had a horseradish peroxidase-conjugated over 1 h at room temperature. For protein detection, a chemiluminescence kit (Amersham, São Paulo/Brazil) was used and the signals were captured with Amersham Imager 600 (GE healthcare life sciences). Optical density (O.D.) of the blotting bands was quantified using Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) software for Windows. Each obtained value was derived from the ratio between arbitrary units



acquired by the protein band quantification and the respective protein content of the  $\beta$ -Actin band. The data were expressed as a percentage of control.

#### Immunofluorescent staining of pp38 and GFAP proteins

Initially, mice were deeply anesthetized with ketamine/xylazine (150/10 mg/kg); subsequently, they were perfused with a saline solution followed by cold 4% paraformaldehyde, and the brains were removed. After 24h, the brains were immersed in 30% sucrose solution for cryoprotection overnight. The hippocampus sections (20  $\mu$ m) were cut in a cryostat microtome (Leica CM1800). After quenching endogenous peroxidase with 3% hydrogen peroxide for 10 min and blocking with normal donkey (DS) serum in sodium phosphate buffer (PBS) at room temperature for 60. Subsequently, the sections were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-pp38 antibody (1:500) and rabbit anti-Gfap antibody (1:1000) in 1% DS diluted in 0.5% PBS. After three washes in PBS, the sections were incubated with anti-rabbit Alexa Fluor® 568 (Invitrogen, 1:1000) in 1% DS diluted in 0.5% PBS for 2 h at room temperature in the dark. After that, the sections were washed three times in PBS and incubated with DAPI (Invitrogen, 1:1000) for 5 min. The sections were washed three times in PBS, mounted on slides with Fluor Save (Merck), and covered with coverslips. Images were captured at a magnification of x100 for analysis. The images of hippocampus sections were obtained on an Axioskop fluorescence microscope (Carl Zeiss) and examined with ImageJ software.

**Table S1.** Antibodies used in this study

Antibody	Molecular Weight	Dilution	Source
Rabbit anti-PARP (full-length and clivated (ADP-ribose) polymerase)	116/89 kDa	1:1000	CellSignaling
Rabbit anti-COX-2 (cyclooxygenase-2)	74 kDa	1:1000	CellSignaling
Mouse anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein)	50 kDa	1:1000	Sigma-Aldrich
Mouse anti-p-JNK and JNK (phosphorylated C-Jun	46/54 kDa	1:1000	Santa Cruz

N-terminal kinase			Biotechnology
Mouse anti-p-ERK1/2 and ERK1/2 (phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinases)	42/44 kDa	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
Rabbit anti-p-p38 and anti-p38 MAPK (phosphorylated p38 mitogenactivated protein kinase;Thr180/Tyr182)	43 kDa	1:1000	CellSignaling
Mouse anti-IL-1 $\beta$ (interleukin 1 $\beta$ )	31 kDa	1:1000	CellSignaling
Rabbit anti-Bcl2 (B-cell lymphoma 2)	28 kDa	1:1000	CellSignaling
Mouse anti-Bax (Bcl-2-associated X protein)	23 kDa	1:1000	Santa Cruz
Mouse anti- $\beta$ -Actin	45 kDa	1:10000	Sigma-Aldrich

## REFERENCES

- Blaser, R., Heyser, C., 2015. Spontaneous object recognition: a promising approach to the comparative study of memory. *Front Behav Neurosci* 9, 183.
- Rosa, R.M., Flores, D.G., Appelt, H.R., Braga, A.L., Henriques, J.A., Roesler, R., 2003. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. *Neurosci Lett* 341, 217-220.
- Takahashi, E., Niimi, K., Itakura, C., 2009. Enhanced CaMKII activity and spatial cognitive function in SAMP6 mice. *Behav Neurosci* 123, 527-532.
- York, J.M., Blevins, N.A., McNeil, L.K., Freund, G.G., 2013. Mouse short- and long-term locomotor activity analyzed by video tracking software. *J Vis Exp*.





## 4 DISCUSSÃO

Os fatores ambientais, entre eles o consumo de dietas inadequadas e a inatividade física, são os que mais contribuem para o desenvolvimento de doenças metabólicas, como a obesidade e a diabetes em humanos. Existem diferentes modelos animais com mutações genéticas que podem ser utilizados para o estudo da relação entre doenças neurodegenerativas e alterações metabólicas (BAUMANN et al., 2020). Entretanto, considerando que o modelo deve ser o mais próximo possível da gênese das doenças em humanos, a indução através do consumo de alimentos altamente palatáveis e com alto valor energético é considerado o mais apropriado (TSCHÖP e HEIMAN, 2001).

Diferentes tipos de dietas podem ser usadas para mimetizar o consumo de alimentos por humanos, sendo que as alterações ocorrem, principalmente, na composição de macronutrientes (lipídeos, carboidratos e proteínas) dessas dietas. Dentre as dietas mais estudadas encontram-se aquelas com alto nível calórico ou com alto teor de lipídeos e/ou carboidratos. Estudos mostram que o consumo excessivo de alimentos com baixa qualidade nutritiva causa alterações das funções normais do organismo, principalmente quando ingeridas por períodos prolongados; isso pode ocorrer devido à quantidade demasiada de calorias, gorduras e açúcares fornecida ao organismo; além de outras hipóteses, como a produção de radicais livres através do metabolismo desses componentes (MACQUEEN et al., 2007).

Embora seja comum que os modelos de indução utilizando dietas esclareçam mecanismos relacionados às alterações metabólicas provindas de doenças, tais como a obesidade e diabetes, sabe-se que o consumo de dietas ricas em lipídeos (60%) ou ricas em carboidratos (58%), tanto por períodos curtos como prolongados, tem sido demonstrado como fator contribuinte para danos cognitivos devido a alterações na região hipocampal em camundongos (DAVIS et al., 2020). Nessa perspectiva, com o objetivo de propor novas terapias e alternativas, os experimentos dessa tese avaliaram as propriedades benéficas do exercício aeróbico (**artigo**) e do composto orgânico de selênio [(*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>] (**manuscrito**) frente a danos na aprendizagem e memória, bem como buscou elucidar os seus mecanismos de ação, após a exposição a uma dieta modificada em sua composição (20% lipídeos e 20% carboidratos) durante a infância e adolescência de camundongos; intervalo de tempo correspondente ao maior desenvolvimento, crescimento e maturação cerebral (HIGUERA-MATAS et al., 2012).

O **artigo** teve como foco avaliar os efeitos de uma terapia não farmacológica, o exercício de natação de intensidade moderada, no comprometimento da aprendizagem e memória em

camundongos jovens alimentados com uma dieta hipercalórica e seus mecanismos de ação. De modo geral, os maus hábitos alimentares aliados ao sedentarismo são reportados como fatores de risco para o desenvolvimento de doenças. Existem diversas modalidades de exercício físico capazes de promover gasto energético e a manutenção da saúde em humanos (SHOEMAKER et al., 2019); sendo que exercícios aeróbicos, como a natação, são usualmente escolhidos para experimentos em animais (MURAKAMI et al., 2009; WANG, X. et al., 2020b), visto que roedores possuem habilidade natural de nadar e que nesse modelo podem ocorrer adaptações ao treinamento físico semelhantes às observadas em seres humanos (VOLTARELLI et al., 2002). Além dos benefícios descritos na literatura, o exercício de natação foi escolhido por ser um método de fácil acesso e já ter sido utilizado como uma terapia não-farmacológica em estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa (CECHELLA et al., 2017; LEITE et al., 2016). Ainda, foi realizado um protocolo piloto com o intuito de comparar os efeitos do exercício de natação e o exercício de força em testes comportamentais de aprendizagem e memória; no entanto, apenas o exercício de natação foi eficiente em promover uma melhora na aprendizagem e memória de camundongos jovens submetidos a uma dieta hipercalórica (dados não publicados).

Apesar da composição da dieta, a fonte (gordura de porco e xarope de milho) e a percentagem de lipídeos e carboidratos terem sido baseadas na literatura (LU, C. et al., 2017; MATHEUS et al., 2017), foram realizados testes de palatabilidade e quantidade de ração ingerida para avaliar a adaptação dos animais a exposição a uma dieta diferente do habitual (dados não publicados). Isso, pois, uma das variáveis comumente mensuradas em estudos animais com intervenções dietéticas é a quantidade de comida ingerida (ELLACOTT et al., 2010), podendo ser verificada através da pesagem diária de ração consumida. O **artigo** apresenta detalhadamente a constituição das duas rações usadas e a diferença calórica entre elas; ao contrário da literatura que geralmente apresenta estudos em que a quantidade do macronutriente modificado é alta (acima de 40%) (DAVIS et al., 2020; ZHAO, Z. et al., 2019), com o **artigo** foi possível observar resultados similares com pequenas alterações na dieta (20% lipídeos e 20% carboidratos) em um período de exposição relativamente curto (28 dias). Outras variáveis importantes que podem indicar à adesão dos animais a dieta são aquelas relacionadas ao ganho de peso e a quantidade de gordura corporal de cada animal (ROSINI et al., 2012). Os resultados do **artigo** demonstram que o protocolo de natação foi efetivo em proteger contra um aumento da gordura relativa de camundongos jovens expostos a uma dieta hipercalórica. No entanto, não houve aumento significativo no ganho de peso corporal e da ingestão diária da

dieta hipercalórica durante os 28 dias de protocolo experimental. Apesar disso, o **artigo** mostra uma correlação positiva entre a gordura relativa e o consumo total da dieta hipercalórica, sugerindo que os camundongos, possivelmente, consumiram uma maior quantidade da dieta hipercalórica do que da dieta padrão no decorrer do protocolo experimental.

Nesse contexto, um estudo demonstra que o consumo em longo prazo de uma dieta hiperlipídica, composta por 45 a 60% de lipídios está associado ao aumento do desenvolvimento de obesidade e diabetes; doenças crônicas sistêmicas capazes de afetar o metabolismo cerebral, ocasionando danos cognitivos em animais (FREIRE-REGATILLO et al., 2019). Porém, as propensões para ganhar peso ou desenvolver complicações secundárias da obesidade são parcialmente um resultado genético, incluindo o sexo, mas também estão relacionados à idade e ao tempo de duração da dieta ao qual um indivíduo é exposto (FREIRE-REGATILLO et al., 2019). Um exemplo é que durante o período perinatal, o consumo materno de dietas com alto teor lipídico pode predispor distúrbios neurológicos na prole conduzindo ao envelhecimento patológico do cérebro, afetando principalmente as estruturas do hipocampo e do córtex pré-frontal (GLENDINING et al., 2018; KIM, T.-W. e PARK, 2018). A composição da dieta é outro fator interveniente no desenvolvimento de alterações no organismo e suas complicações, visto que investigações com diferentes tipos de dietas (hiperlipídica, hipercalórica e com alto teor de colesterol), porém com animais de idade e peso semelhantes apresentaram resultados diferentes quanto ao ganho de peso corporal no final do protocolo experimental, ou seja, alguns autores verificaram aumento no peso corporal (GUERRA et al., 2007) enquanto que outros não (ROSINI et al., 2012; ZAMBON et al., 2009). Uma possível hipótese para a falta de alterações no ganho de peso corporal demonstrado no **artigo** é a modificação da composição corporal dos animais, ou seja, enquanto há um aumento do percentual de gordura poderá estar ocorrendo a diminuição do percentual de massa magra; no entanto, não foi verificado a quantidade de massa magra dos animais nesse protocolo experimental.

Após a confirmação de que os animais aderiram ao consumo da dieta hipercalórica e que está foi capaz de induzir alterações corporais (ganho de gordura relativa, **artigo**) assim como alterações em parâmetros sanguíneos; aumento nos níveis de triglicerídeos e diminuição do colesterol-HDL, demonstrados em um estudo prévio (JARDIM et al., 2021), utilizando o mesmo protocolo experimental do **artigo**, realizou-se testes preditivos de aprendizagem e memória nos animais. A formação da aprendizagem e memória é um processo complexo que envolve inúmeros eventos bioquímicos, neuroquímicos e moleculares em regiões específicas do cérebro (IZQUIERDO, A. et al., 2017). Os testes comportamentais como o teste de



reconhecimento do objeto (TRO), localização do objeto (TLO) e o teste do labirinto aquático de Morris (LAM) são comumente utilizados para investigar diferentes tipos de memória em roedores. Tanto o TRO como o TLO baseiam-se na tendência natural dos roedores em explorar novos estímulos em um contexto familiar (LEGER et al., 2013; LIAN et al., 2018). Resumidamente, ambos os testes consistem em duas fases principais sendo que na primeira (sessão de familiarização) o animal explora livremente dois objetos similares, enquanto que na segunda fase (sessão de teste), um dos objetos é substituído por um objeto novo com características diferentes (BEVINS e BESHEER, 2006; LEGER et al., 2013). No **artigo** e no **manuscrito** o TRO foi usado para acessar as memórias de curta e longa duração assim como o TLO para avaliar a memória espacial dos animais. Os resultados do **artigo** demonstraram que o exercício de natação protegeu contra o decréscimo nos índices de memória de reconhecimento e de localização induzidos pela exposição a uma dieta hipercalórica em camundongos jovens.

Embora com os resultados obtidos no TRO e TLO fosse possível considerar que uma dieta hipercalórica provocou danos de aprendizagem e memória e que o protocolo de natação usado nesse estudo apresentou efeitos benéficos, foi realizado o teste do LAM com o propósito de confirmar esses resultados. O LAM é um teste comportamental utilizado para o estudo de aprendizagem e memória espacial dependentes da região hipocampal em roedores (BROMLEY-BRITS et al., 2011), e tem sido realizado para a validação de modelos animais de doenças com alterações na função cognitiva (BROMLEY-BRITS et al., 2011). Esse é um teste simples que consiste na capacidade de cada animal em encontrar uma plataforma levemente submersa dentro de uma piscina circular com água opaca; cada animal pode localizar-se espacialmente através de pistas visuais adicionadas em torno do aparato (BYE et al., 2018). No **artigo** os resultados indicaram que apesar da exposição à dieta hipercalórica induzir o dano na aprendizagem e memória espacial em camundongos jovens, os efeitos do exercício de natação não foram observados em todos os parâmetros analisados. Porém, examinados em conjunto os resultados dos testes comportamentais apresentados no **artigo**, pode-se sugerir que o exercício de natação de intensidade moderada é uma alternativa não-farmacológica com efeitos nos danos de aprendizagem e memória em camundongos jovens expostos a uma dieta hipercalórica

Em busca de responder o próximo objetivo do **artigo**: esclarecer o mecanismo de ação envolvido nos efeitos do exercício de natação na aprendizagem e memória de camundongos alimentados com uma dieta hipercalórica; foram realizadas análises bioquímicas e moleculares no hipocampo desses animais. Embora se saiba que a capacidade de adquirir, armazenar e evocar informações seja inerente a muitas áreas ou subsistemas cerebrais, não sendo função

exclusiva de nenhuma delas, o hipocampo foi selecionado por ser uma região altamente plástica tendo o seu envolvimento na formação e integração de vários tipos de memória já descritos (IZQUIERDO, A. et al., 2017; VORHEES e WILLIAMS, 2014). Relacionado a isso, estudos demonstram que insultos dietéticos, como as dietas ricas em gordura e carboidratos, causam lesões na estrutura hipocampal resultando em danos cognitivos em animais (BEILHARZ, J. E. et al., 2014; CORDNER e TAMASHIRO, 2015). Ademais, a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos é uma característica patológica comum em doenças neurocognitivas, visto que o cérebro é mais suscetível ao ataque oxidativo do que outros órgãos (PRATICÒ, 2008). Com isso, os resultados do **artigo** demonstraram um desequilíbrio na homeostase redox devido a alterações nos níveis dos marcadores de dano oxidativo (TBARS e NPSH) em hipocampo de camundongos alimentados com a dieta hipercalórica; em contrapartida, o exercício de natação modulou o estado redox pela restauração de ambos os marcadores de dano.

Para complementar a caracterização de um estado de estresse oxidativo, o **artigo** também demonstrou a contribuição da via de sinalização Nrf2/Keap1/OH-1 em hipocampo de camundongos jovens. Dessa forma, os resultados mostraram que o protocolo de natação modulou os níveis das proteínas Nrf2, Keap1 e OH-1 alterados pela exposição à dieta hipercalórica. A principal função dessa via está relacionada com a ativação de uma resposta celular antioxidante através da transcrição de uma variedade de genes capazes de combater os efeitos nocivos de insultos extrínsecos e intrínsecos, como xenobióticos e estresse oxidativo (JARAMILLO e ZHANG, 2013). Sendo assim, uma *downregulation* da via do Nrf2 implica diretamente na redução de fatores importantes para manutenção da homeostase redox, como as proteínas antioxidantes e enzimas de desintoxicação de fases I e II (como as hemeoxigenases)(KANSANEN et al., 2013; KENSLER et al., 2007).

Ademais, é importante mencionar que durante o estresse oxidativo o DNA, principalmente o mitocondrial, esteja muito susceptível às lesões oxidativas por estar muito próximo dos sítios geradores de EROs (BOHR, 2002). Supõe-se que na ausência de um reparo eficiente pelas defesas antioxidantes, o desequilíbrio redox possa levar ao acúmulo de mutações e à disfunção mitocondrial, a qual está intimamente relacionada a processos patológicos como o declínio cognitivo e envelhecimento (SILVA, W. J. M. D. e FERRARI, 2011). Corroborando á isso, o **artigo** revela que a exposição à dieta hipercalórica diminuiu os níveis da proteína fator de transcrição mitocondrial A (mtTFA), que é um potente estimulador da duplicação do DNA mitocondrial e, conseqüentemente, da biogênese mitocondrial (VIÑA et al., 2009); enquanto que o protocolo de natação foi eficiente em restaurar os níveis dessa proteína. Hipoteticamente,

é possível que essa redução na mTFA seja resultado de uma alta produção de EROs observado pelos marcadores de dano oxidativo, bem como de uma *downregulation* da via do Nrf2 na região hipocampal de camundongos jovens alimentados com a dieta.

Apesar da literatura mostrar diferentes relatos de que o exercício físico em geral possui efeitos benéficos na melhora de danos de memória e aprendizagem e até na progressão de doenças neurodegenerativas (CASSILHAS et al., 2007; MAYO et al., 2021), ainda são poucos os estudos que associam esses efeitos durante os períodos iniciais de vida. Um diferencial tanto do **artigo** como do **manuscrito** dessa tese foi o período de idade escolhido, isso, pois o protocolo de exposição à dieta hipercalórica foi realizado durante o período juvenil (4-6 semanas de idade) até o início da puberdade (6-10 semanas de idade) dos camundongos (WANG, S. et al., 2020a). Correlacionando a idade entre humanos e camundongos baseado nos estágios de crescimento, o período utilizado aqui corresponde desde a infância e adolescência até o início da vida adulta em humanos (0-20 anos de vida) (WANG, S. et al., 2020a).

Em relação ao SNC, os roedores apresentam importante desenvolvimento no período pós-natal enquanto que em humanos a maior parte ocorre no período pré-natal (DWYER et al., 2008). Sabe-se que o cérebro de roedores é considerado extremamente vulnerável a quaisquer estímulos nocivos, como por exemplo, a exposição a substâncias exógenas que possam causar efeitos irreversíveis na estrutura e função do tecido (LOI et al., 2017; SEMPLE et al., 2013). Estudos realizados anteriormente a essa tese, confirmam que durante o período de desenvolvimento o SNC é sensível a administração de um agente tóxico exógeno, o qual foi capaz de prejudicar o funcionamento normal do cérebro com impacto de longa duração em camundongos (JARDIM et al., 2020; JARDIM et al., 2017; QUINES et al., 2018; ROSA et al., 2016). Corroborando a isso, ambos estudos apresentados nessa tese (**artigo e manuscrito**) mostram a vulnerabilidade do cérebro de camundongos através do desenvolvimento de danos à memória e aprendizagem quando submetidos a uma dieta hipercalórica durante os períodos iniciais de vida.

Por outro lado, estudos mostram que a deficiência nutricional de selênio pode ocasionar desde um prejuízo no sistema imune (CALDER, P. et al., 2020) e aumento do estresse oxidativo (TINGGI, 2008) até danos permanentes ao cérebro (STEINBRENNER e SIES, 2013); ainda, algumas doenças neurológicas como a Doença de Alzheimer, depressão e ansiedade têm sido associadas com a deficiência prolongada de selênio (PILLAI et al., 2014). Interessantemente, estudos recentes mostram a relação entre baixos níveis de selênio e a incidência da COVID-19 em pacientes (RAYMAN et al., 2020) e, que uma suplementação adequada de selênio pode

promover a redução das condições patológicas causadas pela infecção por COVID-19 em pacientes (TAHERI et al., 2020). Levando-se em consideração a importância do selênio para saúde em geral, justifica-se a investigação e o desenvolvimento de drogas que contenham em sua estrutura a molécula de selênio. Nesse contexto, no **manuscrito** os animais foram expostos exatamente ao mesmo protocolo de indução (**artigo**) tendo como dessemelhança o uso do composto ( $m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$ )<sub>2</sub> como terapia farmacológica.

No **manuscrito** foi utilizado a dose de 5 mg/kg/dia, via intragástrica durante 7 dias consecutivos para o tratamento com o composto. Em um estudo prévio, foi realizada a administração aguda de ( $m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$ )<sub>2</sub> em diferentes doses (0.1, 1 e 5 mg/kg, via intragástrica) no qual os resultados demonstram que a dose de 5 mg/kg protege de forma mais efetiva contra comportamentos do tipo-depressivo em camundongos (ROSA et al., 2018). Também já é descrito que a administração de ( $m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$ )<sub>2</sub> na dose de 5 mg/kg; via intragástrica, atenua o aparecimento de sinais físicos semelhantes ao comportamento do tipo-depressivo induzidos por morfina em camundongos (MARTINS et al., 2020). Ademais, resultados de um estudo recente indicam que o tratamento durante 7 dias com ( $m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$ )<sub>2</sub> na dose de 5 mg/kg; via intragástrica, apresenta efeito do tipo-antidepressivo através da modulação dos níveis de receptores opioides, bem como do estresse oxidativo em córtex de camundongos jovens (MÜLLER et al., 2021). Sob o ponto de vista terapêutico, esses estudos ratificam o fato do ( $m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$ )<sub>2</sub> na dose de 5 mg/kg apresentar efeitos benéficos ao SNC.

Estudos pré-clínicos realizados com o ( $m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$ )<sub>2</sub>, reportam efeitos do tipo antidepressivo (MÜLLER et al., 2021), ansiolítico (BRÜNING et al., 2009) e antinociceptivo (ARAÚJO et al., 2020); no entanto, até o presente momento pouco se sabe a respeito dos benefícios desse composto em relação à cognição em animais. Por isso, como novidade em relação às propriedades farmacológicas já descritas do ( $m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$ )<sub>2</sub>, os resultados do **manuscrito** demonstraram que a administração de ( $m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$ )<sub>2</sub> (5 mg/kg, via intragástrica) foi efetiva em restaurar a aprendizagem e memória de camundongos jovens submetidos a uma dieta hipercalórica. Nesse estudo, foi observado que o tratamento com o ( $m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$ )<sub>2</sub> aumentou os índices percentuais nos testes comportamentais TRO e TLO, os quais foram diminuídos pela dieta hipercalórica; assim, os efeitos do ( $m\text{-CF}_3\text{-PhSe}$ )<sub>2</sub> atingem tanto as memórias de curta e longa duração como a memória espacial. Em conjunto, com os resultados comportamentais do **artigo** e do **manuscrito** é possível validar a hipótese de que baixas modificações na composição dietética (20% lipídeos e 20% carboidratos) estão envolvidas no comprometimento da aprendizagem e memória de camundongos jovens.

Evidências apontam para o fato de que o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> promova seus efeitos no SNC devido a uma das características importantes da classe dos disselenetos de diargonoila: sua propriedade lipofílica, sendo assim capaz de atravessar a barreira hemato-encefálica e conseqüentemente, exercer seu papel no cérebro. Nesse sentido, um estudo realizado com o protótipo dessa classe [(PhSe)<sub>2</sub>] demonstrou a distribuição dos níveis de selênio após administração do (PhSe)<sub>2</sub> (500 mg/kg, via intragástrica) em camundongos e ratos; os resultados desse estudo indicam que altos níveis de selênio são detectados no cérebro, sugerindo que o (PhSe)<sub>2</sub> é capaz de atingir o SNC (PRIGOL et al., 2012). Em virtude disso, acredita-se que análogos estruturais do (PhSe)<sub>2</sub>, como é o exemplo do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>, também possuam a habilidade de atingir o cérebro (NOGUEIRA et al., 2001; PRIGOL et al., 2007). Confirmando essa hipótese, diversos estudos descrevem efeitos centrais relacionados à administração de compostos orgânicos de selênio análogos ao (PhSe)<sub>2</sub>, dentre eles encontram-se por exemplo: a contribuição da via Nrf2/Keap-1 no efeito do tipo-antidepressivo em córtex de camundongos diabéticos (ZBOROWSKI et al., 2019b) e a modulação hipocampal da via BDNF/TrkB na melhora do dano de memória em camundongos diabéticos (ZBOROWSKI et al., 2019a).

Outros resultados importantes demonstrados no **manuscrito** foram aqueles referentes a confirmação da adesão da dieta hipercalórica pelos animais. Assim como observado no **artigo**, houve um aumento da gordura relativa sem alterações significativas do peso corporal dos camundongos alimentados com a dieta hipercalórica, durante os 28 dias de protocolo experimental. Os efeitos do tratamento com o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> foram semelhantes aos obtidos com o exercício de natação (**artigo**); isto é, observou-se a diminuição significativa da quantidade de gordura relativa quando em comparação com os camundongos induzidos com a dieta hipercalórica. Uma hipótese seria de que os compostos orgânicos de selênio apresentem efeitos similares aos anorexígenos. Essa hipótese baseia-se em estudos que demonstram os efeitos benéficos de um análogo estrutural ao (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> em reduzir o acúmulo de gordura abdominal (QUINES et al., 2015), além de apresentar um efeito anorexígeno em ratos (BORTOLATTO et al., 2015). Embora esses estudos não sejam específicos para o composto (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>, estão de acordo com o resultado da gordura relativa encontrado no **manuscrito**. Além disso, o **manuscrito** demonstrou resultados de uma correlação positiva entre os testes comportamentais de memória e a gordura relativa; indicando uma possível relação entre a adesão pela dieta hipercalórica com os prejuízos de aprendizagem e memória em camundongos jovens.



Dentre os múltiplos alvos de ação do  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  que são descritos no SNC está a propriedade anti-inflamatória (BRÜNING et al., 2015b). A resposta inflamatória inicia com a biossíntese de proteínas pró-inflamatórias, as quais tem sua produção controlada por muitas vias de sinalização, incluindo as MAPKs e a via do  $\text{NF}\kappa\beta$  (MOENS et al., 2013). Os resultados apresentados no **manuscrito** indicaram que a exposição a uma dieta hipercalórica induziu um aumento da fosforilação da ERK, JNK e p38 MAPKs, bem como das razões pERK/ERK, pJNK/JNK e pp38/p38. Adicionado a isso, outro indicativo de uma resposta inflamatória induzida pela dieta hipercalórica foi o aumento nos níveis de proteínas pró-inflamatórias em hipocampo de camundongos (COX-2, IL-1 $\beta$  e GFAP) em comparação os grupos controle. É importante mencionar que o tratamento com  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  foi efetivo em restaurar o quadro inflamatório descrito no **manuscrito**. De fato, uma administração subcrônica de  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  apresenta eficácia em normalizar níveis de citocinas pró-inflamatórias e a ativação da p38 MAPK,  $\text{NF}\kappa\beta$  e COX-2, tanto em soro como no córtex cerebral e hipocampo de camundongos (BRÜNING et al., 2015a). A modulação da JNK e p38 MAPKs pelo  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  também é demonstrada por um estudo que avaliou essa via de sinalização em córtex pré-frontal de camundongos submetidos a modelos de estresse (ROSA et al., 2018).

O processo inflamatório é essencial para uma resposta tecidual adequada de reparo frente a injúrias, traumas e infecções; no entanto, a magnitude e duração das respostas inflamatórias devem ser cuidadosamente reguladas pelas vias de sinalização para evitar danos aos tecidos e doenças inflamatórias crônicas (KYRIAKIS e AVRUCH, 2012). A maioria das doenças inflamatórias crônicas (exemplo: obesidade e diabetes) são influenciadas pela nutrição, uma vez que o metabolismo dos alimentos está intimamente associado a processos inflamatórios em humanos (CALDER et al., 2013; HOTAMISLIGIL, 2006). A exposição a dietas ricas em lipídeos (40%) induz processos neuroinflamatórios através do aumento da fosforilação da JNK e p38 MAPKs e da via de sinalização do  $\text{NF}\kappa\beta$ ; essa resposta inflamatória é relacionada com a perda da plasticidade sináptica e formação de placas beta-amiloides na Doença de Alzheimer em camundongos (KOTHARI et al., 2017). Embora não tenham sido investigadas outras vias de sinalização relacionadas à inflamação, os resultados do **manuscrito** enriquecem a literatura demonstrando que alterações dietéticas (20% lipídeos e 20% carboidratos) possivelmente influenciem no desenvolvimento de prejuízos de aprendizagem e memória associados ao aumento da resposta inflamatória em hipocampo de camundongos jovens. Além disso, os dados do **manuscrito** mostraram um aumento do tecido adiposo branco em decorrência da dieta; este tecido induz a secreção de citocinas (adipocinas) com efeito

sistêmico, neuroendócrino e autócrino/parácrino, as quais desencadeiam o um quadro metainflamatório podendo contribuir para o quadro inflamatório observado no SNC.

Além da inflamação, tanto a JNK quanto a p38 MAPKs estão envolvidas em outros mecanismos de ação que podem influenciar na cognição de animais. Quando ativadas por fosforilação, ambas proteínas podem promover apoptose através do aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas e diminuição das anti-apoptóticas (CUENDA e ROUSSEAU, 2007; DHANASEKARAN e REDDY, 2008). Visto que a apoptose tem sido considerada uma via de sinalização importante para a evolução de danos cognitivos resultantes de neuroinflamação (YU et al., 2019), no **manuscrito** foi investigada proteínas de vias apoptóticas para ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos de ação relacionados com prejuízos de aprendizagem e memória induzidos pela dieta hipercalórica, bem como com os efeitos do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>. Dessa forma, os resultados do **manuscrito** demonstraram que uma dieta hipercalórica causou: um aumento nos níveis da PARP clivada e na razão PARP clivada/PARP total; aumento da BAX e na razão BAX/BcL2; uma diminuição da BcL2 em hipocampo de camundongos jovens quando comparado ao grupo controle. Ainda, pela primeira vez, foi demonstrado que o tratamento com (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> modulou essas proteínas pró- e anti-apoptóticas, alteradas pela exposição a dieta hipercalórica. De acordo, a exposição crônica a uma dieta com alto teor de lipídeos (42%) + frutose (30%) mostrou-se capaz de aumentar a produção hipocampal de citocinas inflamatórias e pró-apoptóticas ocasionando déficits cognitivos em ratos (YU et al., 2019). Por isso, é possível hipotetizar que tanto os mecanismos inflamatórios como os apoptóticos contribuam para a indução dos prejuízos de aprendizagem e memória observados no **manuscrito**.

É importante lembrar que nenhuma das terapias (não-farmacológica e farmacológica), assim como o protocolo de indução com a dieta hipercalórica realizados nessa tese alterou a atividade locomotora dos animais. Esses resultados foram demonstrados pelos parâmetros locomotores do LAM (**artigo**) e da caixa de atividades (**artigo** e **manuscrito**). Assim, descartou-se que os testes comportamentais de memória e aprendizagem tenham sido influenciados por alterações na coordenação locomotora e capacidade exploratória dos animais.

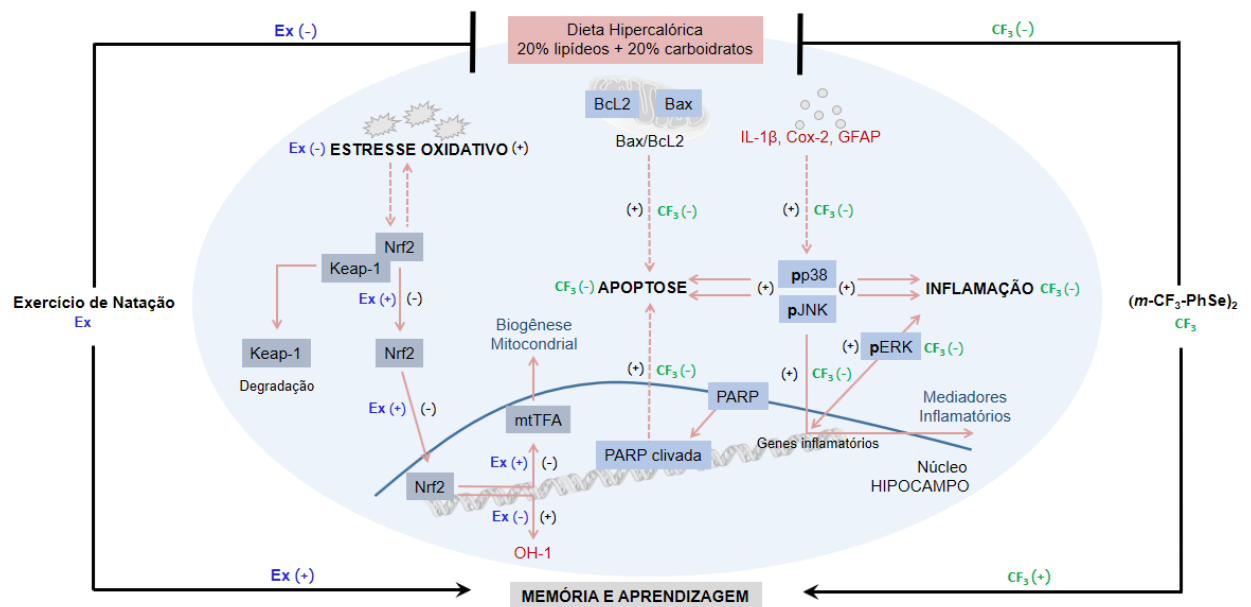
Conforme discutido, os danos comportamentais de aprendizagem e memória induzidos pela exposição à dieta hipercalórica foram amenizados tanto pelo exercício de natação como pelo tratamento com (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub>. No entanto, nessa tese não foi possível afirmar qual das duas terapias apresentou melhor eficácia, pois, não foram realizadas comparações estatísticas entre elas. Assim, para a escolha da melhor estratégia terapêutica deve ser preconizada a adesão e disponibilidade de cada paciente.

## 5 CONCLUSÃO

O conjunto de resultados apresentados nessa tese indicam que o (i) exercício de natação e a (ii) administração de  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  apresentaram efeito contra os danos em diferentes tipos de memória em camundongos jovens alimentados com uma dieta hipercalórica (20% lipídeos e 20% carboidratos). O exercício de natação modulou (iii) a via Nrf2/Keap/OH-1 e (iv) aumentou os níveis da proteína mtTFA, relacionada a biogênese mitocondrial. O  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  modulou (v) a via das MAPKs e de proteínas inflamatórias, além de (vi) restaurar os níveis de proteínas pró e anti-apoptóticas na região hipocampal de camundongos jovens (Figura 6). Ambos tratamentos exerceram efeitos sobre alterações do conteúdo de gordura abdominal.

Embora tenham sido estudadas vias de sinalização diferentes para cada terapia proposta nesta tese, ambas são relevantes pois, participam da formação e manutenção da aprendizagem e memória, que é um processo complexo que envolve inúmeros eventos moleculares. Assim, estratégias terapêuticas que sejam multialvo podem ser uma alternativa para a prevenção e/ou tratamento de doenças cognitivas. Por fim, esse estudo contribuiu para o esclarecimento dos mecanismos de ação do exercício de natação e do composto  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  envolvidos nos prejuízos aprendizagem e memória em camundongos jovens.

Figura 6: Esquema geral dos principais mecanismos envolvidos nos efeitos do exercício de natação e do  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$  em camundongos alimentados com uma dieta hipercalórica durante os períodos iniciais de vida.



Fonte: O próprio autor, 2021. (+) representa a modulação positiva enquanto (-) representa modulação negativa. Ex (azul): Exercício de natação; CF<sub>3</sub> (verde):  $(m\text{-CF}_3\text{-PhSe})_2$ . As flechas cheias indicam efeito direto e as flechas pontilhadas indicam efeitos indiretos.



## 6 PERSPECTIVAS

A seguir as perspectivas para trabalhos futuros:

- I. Realizar um estudo comparativo entre os efeitos do exercício de natação e o (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> frente aos prejuízos aprendizagem e memória induzidos pela dieta hipercalórica;
- II. Avaliar se os efeitos antioxidante do exercício de natação, assim como anti-apoptótico e anti-inflamatório do (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> abrangem tecidos periféricos;
- III. Investigar se ambas as alternativas terapêuticas exercem efeitos positivos em alterações em enzimas metabólicas causadas pela dieta hipercalórica;
- IV. Avaliar se existe efeito sexo-específico nos efeitos de melhora da aprendizagem e memória do exercício de natação e do tratamento com (*m*-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> usando camundongos fêmeas expostos a dieta hipercalórica





## 7 REFERÊNCIAS

ABD AL HALEEM, E. N.; EL-BAKLY, W. M. The role of MAPK signaling pathway in selenium amelioration of high fat/high cholesterol diet-induced tauopathy in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 302, p. 108-116, 2019.

AL-AUBAIDY, H. A.; JELINEK, H. F. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. **European Journal of Endocrinology**, v. 164, n. 6, p. 899-904, 2011.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-58, 2007.

ANTUNES, H. K. M. et al. Exercício físico e função cognitiva: uma revisão. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 12, n. 2, p. 108-114, 2006.

APOVIAN, C. M.; GOKCE, N. Obesity and Cardiovascular Disease. **Circulation**, v. 125, n. 9, p. 1178-1182, 2012.

ARAUJO, P. C. O. et al. Effect of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide on acute and subchronic animal models of inflammatory pain: Behavioral, biochemical and molecular insights. **Chemico-Biological Interactions**, v. 317, p. 108941, 2020.

BARBOSA-DA-SILVA, S. et al. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. **Hepatology Research**, v. 44, n. 4, p. 450-459, 2014.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, N. V. et al. Organoselenium compounds as mimics of selenoproteins and thiol modifier agents. **Metallomics**, v. 9, n. 12, p. 1703-1734, 2017.

BAUMANN, P. et al. Diabetes type 2 risk gene Dusp8 is associated with altered sucrose reward behavior in mice and humans. **Brain and Behavior**, v. 11, n. 1, 2020.

BEAR, M. et al. **Neuroscience: Exploring the brain**. Jones & Bartlett Learning, LLC, 2020. ISBN 1284211282.

BEAR, M. F. et al. **Neuroscience: Exploring the Brain**. 3rd ed. United States of America: 2007. 898

BEILHARZ, J. et al. Diet-Induced Cognitive Deficits: The Role of Fat and Sugar, Potential Mechanisms and Nutritional Interventions. **Nutrients**, v. 7, n. 8, p. 6719-6738, 2015.

BEILHARZ, J. E. et al. Short exposure to a diet rich in both fat and sugar or sugar alone impairs place, but not object recognition memory in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 37, p. 134-141, 2014.

BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1306-1311, 2006.

BEZERRA, I. N. et al. Food consumed outside the home in Brazil according to places of purchase. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, n. 0, p. 15, Mar 23 2017.

BOHR, V. A. DNA-Related Pathways Defective in Human Premature Aging. **The Scientific World JOURNAL**, v. 2, p. 1216-1226, 2002.

BORGES, L. P. et al. Oral administration of diphenyl diselenide protects against cadmium-induced liver damage in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 171, n. 1, p. 15-25, 2008.

BORTOLATTO, C. F. et al. Effects of diphenyl and p-chloro-diphenyl diselenides on feeding behavior of rats. **Psychopharmacology**, v. 232, n. 13, p. 2239-2249, 2015.

BROMLEY-BRITS, K. et al. Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer's Disease Model Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 53, 2011.

BRÜNING, C. A. et al. Serotonergic systems are implicated in antinociceptive effect of m - trifluoromethyl diphenyl diselenide in the mouse glutamate test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 125, p. 15-20, 2014.

BRÜNING, C. A. et al. 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 and Biological Psychiatry**, v. 63, p. 35-46, 2015a.

BRÜNING, C. A. et al. Depressive-like behavior induced by tumor necrosis factor- $\alpha$  is attenuated by m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. **Journal of Psychiatric Research**, v. 66-67, p. 75-83, 2015b.

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

BRÜNING, C. A. et al. Evidence for the involvement of  $\mu$ -opioid and  $\delta$ -opioid receptors in the antinociceptive effect caused by oral administration of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice. **Behavioural Pharmacology**, v. 21, n. 7, p. 621-626, 2010.

BRÜNING, C. A. et al. Antidepressant-like effect of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in the mouse forced swimming test involves opioid and serotonergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 658, n. 2-3, p. 145-149, 2011.

BUDIARDJO, I. et al. Biochemical Pathways of Caspase Activation During Apoptosis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 15, n. 1, p. 269-290, 1999.

BURK, R. F.; HILL, K. E. Selenoprotein P—Expression, functions, and roles in mammals. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1790, n. 11, p. 1441-1447, 2009.

BYE, C. M. et al. The effects of pool shape manipulations on rat spatial memory acquired in the Morris water maze. **Learning & Behavior**, v. 47, n. 1, p. 29-37, 2018.

CALDER et al. A Consideration of Biomarkers to be Used for Evaluation of Inflammation in Human Nutritional Studies. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. S1, p. S1-S34, 2013.

CALDER, P. et al. Optimal Nutritional Status for a Well-Functioning Immune System Is an Important Factor to Protect against Viral Infections. **Nutrients**, v. 12, n. 4, p. 1181, 2020.

CARVALHO, M. F. et al. Experimental diet based on the foods listed in the Family Budget Survey is more detrimental to growth than to the reflex development of rats. **Revista de Nutrição**, v. 26, n. 2, p. 177-196, 2013.

CASSILHAS, R. C. et al. The Impact of Resistance Exercise on the Cognitive Function of the Elderly. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1401-1407, 2007.

CECHELLA, J. L. et al. The impact of a diphenyl diselenide-supplemented diet and aerobic exercise on memory of middle-aged rats. **Physiology & Behavior**, v. 135, p. 125-129, 2014.

CECHELLA, J. L. et al. Neuroprotective Benefits of Aerobic Exercise and Organoselenium Dietary Supplementation in Hippocampus of Old Rats. **Molecular Neurobiology**, 2017.

CHEN, W.-Y.; LIN, F.-H. Oxidized Hyaluronic Acid Hydrogels as a Carrier for Constant-Release Clenbuterol Against High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 2021.

CHORLEY, B. N. et al. Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. 7416-7429, 2012.

CHRIST, A. et al. Western Diet and the Immune System: An Inflammatory Connection. **Immunity**, v. 51, n. 5, p. 794-811, 2019.

CHRISTOPHERSON, K. S. et al. Thrombospondins Are Astrocyte-Secreted Proteins that Promote CNS Synaptogenesis. **Cell**, v. 120, n. 3, p. 421-433, 2005.

CIOFFI, F. et al. Molecular Mechanisms and Genetics of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 72, n. 4, p. 981-1017, 2019.

CORDAIN, L. et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 2, p. 341-354, 2005.

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

CROWE, S. et al. Metabolic Remodeling in Adipocytes Promotes Ciliary Neurotrophic Factor-Mediated Fat Loss in Obesity. **Endocrinology**, v. 149, n. 5, p. 2546-2556, 2008.

CUENDA, A.; ROUSSEAU, S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1358-1375, 2007.

DANTAS, W. E. L. **Educação alimentar e nutricional como ferramenta para mudança do padrão nutricional da população brasileira: foco ao resgate da alimentação tradicional**. 2016.

DAVERI, E. et al. Cyanidin and delphinidin modulate inflammation and altered redox signaling improving insulin resistance in high fat-fed mice. **Redox Biology**, v. 18, p. 16-24, 2018.

DAVIDSON, T. L. et al. The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. **Physiology & Behavior**, v. 107, n. 1, p. 26-33, Aug 20 2012.

DAVIS, J. A. et al. High-Fat and High-Sucrose Diets Impair Time-of-Day Differences in Spatial Working Memory of Male Mice. **Obesity**, v. 28, n. 12, p. 2347-2356, 2020.

DE FARIAS, J. et al. Effect of Physical Training on the Adipose Tissue of Diet-induced Obesity Mice: Interaction Between Reactive Oxygen Species and Lipolysis. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 03, p. 190-196, 2012.

DEBNATH, M. et al. Metaflammatory responses during obesity: Pathomechanism and treatment. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 10, n. 2, p. 103-113, 2016.

DHANASEKARAN, D. N.; REDDY, E. P. JNK signaling in apoptosis. **Oncogene**, v. 27, n. 48, p. 6245-6251, 2008.

DIAS, G. R. M. et al. Diphenyl diselenide diet intake improves spatial learning and memory deficits in hypothyroid female rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 2, p. 83-89, 2012.

DINOFF, A. et al. The effect of exercise on resting concentrations of peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in major depressive disorder: A meta-analysis. **Journal of Psychiatric Research**, v. 105, p. 123-131, 2018.

DUMONT, E. et al. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 7, p. 1304-1323, 2006.

DWYER, J. B. et al. Nicotine and brain development. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, v. 84, n. 1, p. 30-44, 2008.

ELLACOTT, K. L. J. et al. Assessment of Feeding Behavior in Laboratory Mice. **Cell Metabolism**, v. 12, n. 1, p. 10-17, 2010.



- ESKELINEN, M. H. et al. Fat intake at midlife and cognitive impairment later in life: a population-based CAIDE study. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 23, n. 7, p. 741-7, Jul 2008.
- FERREIRA, H. D. S. et al. Hipertensão, obesidade abdominal e baixa estatura: aspectos da transição nutricional em uma população favelada. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 2, p. 209-218, 2005.
- FLOHE, L. et al. Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. **FEBS Letters**, v. 32, n. 1, p. 132-134, 1973.
- FRANÇA, F. C. O. et al. Mudanças dos hábitos alimentares provocados pela industrialização e o impacto sobre a saúde do brasileiro. **Anais do I Seminário Alimentação e Cultura na Bahia**, v. 1, p. 1-7, 2012.
- FREIRE-REGATILLO, A. et al. Sex differences in the peripubertal response to a short-term, high-fat diet intake. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 32, n. 1, 2019.
- FULCO, B. C. W. et al. Similar hepatoprotective effectiveness of Diphenyl diselenide and Ebselen against cisplatin-induced disruption of metabolic homeostasis and redox balance in juvenile rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 330, p. 109234, 2020.
- GAINEY, S. J. et al. Short-Term High-Fat Diet (HFD) Induced Anxiety-Like Behaviors and Cognitive Impairment Are Improved with Treatment by Glyburide. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 10, 2016.
- GAN, L.; JOHNSON, J. A. Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 8, p. 1208-1218, 2014.
- GHAVAMI, S. et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. **Progress in Neurobiology**, v. 112, p. 24-49, 2014.
- GLENDINING, K. A. et al. Maternal high fat diet alters offspring epigenetic regulators, amygdala glutamatergic profile and anxiety. **Psychoneuroendocrinology**, v. 96, p. 132-141, 2018.
- GOMES, M. J. et al. Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise. **Oncotarget**, v. 8, n. 12, p. 20428-20440, 2017.
- GOMES, M. J. et al. Effects of aerobic and resistance exercise on cardiac remodelling and skeletal muscle oxidative stress of infarcted rats. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 9, p. 5352-5362, 2020.
- GOSTNER, J. M. et al. Redox regulation of the immune response. **Redox Report**, v. 18, n. 3, p. 88-94, 2013.

GRIVICICH, I. et al. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUALANO, B.; TINUCCI, T. Sedentarismo, exercício físico e doenças crônicas. **Revista Brasileira de Educação Física e Esporte**, v. 25, n. spe, p. 37-43, 2011.

GUERRA, R. L. F. et al. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 6, n. 1, p. 16, 2007.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 4, p. 561-564, 2010.

HADIZADEH-BAZAZ, M. et al. Curcumin attenuates spatial memory impairment by anti-oxidative, anti-apoptosis, and anti-inflammatory mechanism against methamphetamine neurotoxicity in male Wistar rats: histological and biochemical changes. **NeuroToxicology**, 2021.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HIGUERA-MATAS, A. et al. Sex-specific disturbances of the glutamate/GABA balance in the hippocampus of adult rats subjected to adolescent cannabinoid exposure. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 5-6, p. 1975-1984, 2012.

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-867, 2006.

HSU, T. M. et al. Effects of sucrose and high fructose corn syrup consumption on spatial memory function and hippocampal neuroinflammation in adolescent rats. **Hippocampus**, v. 25, n. 2, p. 227-239, 2015.

HUANG, T.-T. et al. Oxidative stress and redox regulation on hippocampal-dependent cognitive functions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 576, p. 2-7, 2015.

HUBER, P. C. et al. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.

IZQUIERDO, A. et al. The neural basis of reversal learning: An updated perspective. **Neuroscience**, v. 345, p. 12-26, Mar 14 2017.

IZQUIERDO, I. et al. Mechanisms for memory types differ. **Nature**, v. 393, n. 6686, p. 635-636, 1998.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 68, n. 3, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I. A. et al. Memória: tipos e mecanismos – achados recentes. **Revista USP**, v. 0, n. 98, p. 9, 2013.

IZQUIERDO, L. A. et al. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, n. 3, p. 269-287, 2002.

JARAMILLO, M. C.; ZHANG, D. D. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. **Genes & Development**, v. 27, n. 20, p. 2179-2191, 2013.

JARDIM, N. S. et al. Swimming training mitigates the sex-specific hepatic disruption caused by a high-calorie diet: The putative modulation of Nrf2/Keap-1 pathway in male mice. **Cell Biochemistry and Function**, 2021.

JARDIM, N. S. et al. Females are more susceptible than male mice to thermal hypernociceptive behavior induced by early-life bisphenol-A exposure: Effectiveness of diphenyl diselenide. **European Journal of Pharmacology**, v. 879, p. 173156, 2020.

JARDIM, N. S. et al. Bisphenol A impairs the memory function and glutamatergic homeostasis in a sex-dependent manner in mice: Beneficial effects of diphenyl diselenide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 329, p. 75-84, Aug 15 2017.

JIMÉNEZ DEL RIO, M.; VÉLEZ PARDO, C. La apoptosis en las enfermedades neurodegenerativas: evidencias y controversias. **Revista de Neurología**, v. 32, n. 09, p. 851, 2001.

JOHNSON, A. R. et al. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, p. 218-238, 2012.

JORQUERA, G. et al. High extracellular ATP levels released through pannexin-1 channels mediate inflammation and insulin resistance in skeletal muscle fibres of diet-induced obese mice. **Diabetologia**, 2021.

KACZMARCZYK, M. M. et al. Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 9, p. 1553-1564, 2013.

KANDEL, E. R. et al. **Principles of neural science**. McGraw-Hill New York, 2000.

KANG, E. B. et al. Neuroprotective Effects of Endurance Exercise Against High-Fat Diet-Induced Hippocampal Neuroinflammation. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 5, 2016.

KANOSKI, S. E.; DAVIDSON, T. L. Western diet consumption and cognitive impairment: Links to hippocampal dysfunction and obesity. **Physiology & Behavior**, v. 103, n. 1, p. 59-68, 2011.

KANOSKI, S. E. et al. The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 21, n. 1, p. 207-19, 2010.

KANSANEN, E. et al. Activation of stress signaling pathways by electrophilic oxidized and nitrated lipids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 6, p. 973-982, 2012.

KANSANEN, E. et al. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 45-49, 2013.

KAUR, S. et al. Selenium attenuates venlafaxine hydrochloride-induced testicular damage in mice via modulating oxidative stress and apoptosis. **Andrologia**, 2021.

KENSLER, T. W. et al. Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 89-116, 2007.

KERR, G. J. et al. Diet-induced obesity leads to behavioral indicators of pain preceding structural joint damage in wild-type mice. **Arthritis Research & Therapy**, v. 23, n. 1, 2021.

KIM, H. J. et al. Neuroprotective Activity of Polyphenol-Rich Ribes diacanthum Pall against Oxidative Stress in Glutamate-Stimulated HT-22 Cells and a Scopolamine-Induced Amnesia Animal Model. **Antioxidants**, v. 9, n. 9, p. 895, 2020.

KIM, T.-W.; PARK, H.-S. Physical exercise improves cognitive function by enhancing hippocampal neurogenesis and inhibiting apoptosis in male offspring born to obese mother. **Behavioural Brain Research**, v. 347, p. 360-367, 2018.

KOISTINAHO, J. et al. Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ : A Mediator of Inflammation in Alzheimer's Disease? **International Journal of Alzheimer's Disease**, v. 2011, p. 1-9, 2011.

KOTHARI, V. et al. High fat diet induces brain insulin resistance and cognitive impairment in mice. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2, p. 499-508, 2017.

KYRIAKIS, J. M.; AVRUCH, J. Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 2, p. 689-737, 2012.

LEGER, M. et al. Object recognition test in mice. **Nature Protocols**, v. 8, n. 12, p. 2531-2537, 2013.

LEITE, M. R. et al. 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.

LEUNER, B.; GOULD, E. Structural Plasticity and Hippocampal Function. **Annual Review of Psychology**, v. 61, n. 1, p. 111-140, 2010.

LI, X. et al. Intracellular degradation of misfolded proteins in polyglutamine neurodegenerative diseases. **Brain Research Reviews**, v. 59, n. 1, p. 245-252, 2008.

LIAN, B. et al. Object, spatial and social recognition testing in a single test paradigm. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 152, p. 39-49, 2018.

LIU, Q. et al. Selenium (Se) plays a key role in the biological effects of some viruses: Implications for COVID-19. **Environmental Research**, v. 196, p. 110984, 2021.

LIU, Z. et al. Sesamol ameliorates high-fat and high-fructose induced cognitive defects via improving insulin signaling disruption in the central nervous system. **Food & Function**, v. 8, n. 2, p. 710-719, Feb 22 2017.

LOI, M. et al. Effects of early-life stress on cognitive function and hippocampal structure in female rodents. **Neuroscience**, v. 342, p. 101-119, 2017.

LOUZADA, M. L. D. C. et al. Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 49, n. 0, 2015.

LU, C. et al. Modulation of the Gut Microbiota by Krill Oil in Mice Fed a High-Sugar High-Fat Diet. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 905, 2017.

LU, Q. et al. Hinokinin alleviates high fat diet/streptozotocin-induced cardiac injury in mice through modulation in oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 137, p. 111361, 2021.

LUCHESE, C. et al. 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. 61, n. 10, p. 1117-1124, 2012.

MACHADO, A. P. R. et al. Neuroinflamação Na Doença De Alzheimer. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, v. 6, n. 14, 2020.

MACQUEEN, H. A. et al. Deleterious effects of a cafeteria diet on the livers of nonobese rats. **Nutrition Research**, v. 27, n. 1, p. 38-47, 2007.

MAESAKO, M. et al. Exercise Is More Effective than Diet Control in Preventing High Fat Diet-induced  $\beta$ -Amyloid Deposition and Memory Deficit in Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 27, p. 23024-23033, 2012.

MANZEL, A. et al. Role of "Western Diet" in Inflammatory Autoimmune Diseases. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 14, n. 1, 2013.

MARTINS, C. C. et al. m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide (m-CF<sub>3</sub>-PhSe)<sub>2</sub> modulates the hippocampal neurotoxic adaptations and abolishes a depressive-like phenotype in a short-term morphine withdrawal in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 98, p. 109803, 2020.

MATHEUS, V. A. et al. Butyrate reduces high-fat diet-induced metabolic alterations, hepatic steatosis and pancreatic beta cell and intestinal barrier dysfunctions in prediabetic mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, n. 12, p. 1214-1226, Jun 2017.



MATIAS, A. et al. Differential Effects of High Sugar, High Lard or a Combination of Both on Nutritional, Hormonal and Cardiovascular Metabolic Profiles of Rodents. **Nutrients**, v. 10, n. 8, p. 1071, 2018.

MATSUDO, S. M. et al. Atividade física e envelhecimento: aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 7, n. 1, p. 2-13, 2001.

MAYO, C. D. et al. A pilot study of the impact of an exercise intervention on brain structure, cognition, and psychosocial symptoms in individuals with relapsing-remitting multiple sclerosis. **Pilot and Feasibility Studies**, v. 7, n. 1, 2021.

MILANSKI, M. et al. Saturated Fatty Acids Produce an Inflammatory Response Predominantly through the Activation of TLR4 Signaling in Hypothalamus: Implications for the Pathogenesis of Obesity. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 359-370, 2009.

MOENS, U. et al. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinases (MAPKAPKs) in Inflammation. **Genes**, v. 4, n. 2, p. 101-133, 2013.

MORASKA, A. et al. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, n. 4, p. R1321-R1329, 2000.

MÜLLER, S. G. et al. Diphenyl diselenide regulates Nrf2/Keap-1 signaling pathway and counteracts hepatic oxidative stress induced by bisphenol A in male mice. **Environmental Research**, v. 164, p. 280-287, 2018.

MÜLLER, S. G. et al. Opioid System Contributes to the Trifluoromethyl-Substituted Diselenide Effectiveness in a Lifestyle-Induced Depression Mouse Model. **Molecular Neurobiology**, 2021.

MURAKAMI, T. et al. Forced swimming and imipramine modify plasma and brain amino acid concentrations in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 602, n. 1, p. 73-77, 2009.

MURIACH, M. et al. Diabetes and the Brain: Oxidative Stress, Inflammation, and Autophagy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

NARAJJI, C. et al. Biological importance of organoselenium compounds. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 69, n. 3, p. 344, 2007.

NARATH, E. et al. Voluntary and forced exercise influence the survival and body composition of aging male rats differently. **Experimental Gerontology**, v. 36, n. 10, p. 1699-1711, 2001.

NOGUEIRA, C. W. et al. Investigations into the potential neurotoxicity induced by diselenides in mice and rats. **Toxicology**, v. 183, n. 1-3, p. 29-37, 2003.

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

NOGUEIRA, C. W. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. **Brain Research.**, v. 906, n. 1-2, p. 157-163, 2001.

NYARADI, A. et al. Prospective associations between dietary patterns and cognitive performance during adolescence. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, v. 55, n. 9, p. 1017-24, Sep 2014.

OBERHEIM, N. A. et al. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. v. 814, p. 23-45, 2012.

PANG, D. et al. Soy isoflavones improve the oxidative stress induced hypothalamic inflammation and apoptosis in high fat diet-induced obese male mice through PGC1-alpha pathway. **Aging**, v. 12, n. 9, p. 8710-8727, 2020.

PAPP, L. V. et al. From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 7, p. 775-806, 2007.

PEKNY, M.; PEKNA, M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. **The Journal of Pathology**, v. 204, n. 4, p. 428-437, 2004.

PETROV, D. et al. High-fat diet-induced deregulation of hippocampal insulin signaling and mitochondrial homeostasis deficiencies contribute to Alzheimer disease pathology in rodents. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1852, n. 9, p. 1687-99, Sep 2015.

PILLAI, R. et al. Selenium and selenoprotein function in brain disorders. **IUBMB Life**, v. 66, n. 4, p. 229-239, 2014.

POLLACK, M. et al. The Role of Apoptosis in the Normal Aging Brain, Skeletal Muscle, and Heart. **Annals of the New York Academy of Sciences.**, v. 959, n. 1, p. 93-107, 2002.

PRADO, W. L. D. et al. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 5, p. 378-383, 2009.

PRATICÒ, D. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease: a reappraisal. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 29, n. 12, p. 609-615, 2008.

PRIGOL, M. et al. Comparative Excretion and Tissue Distribution of Selenium in Mice and Rats Following Treatment with Diphenyl Diselenide. **Biological Trace Element Research**, v. 150, n. 1-3, p. 272-277, 2012.

PRIGOL, M. et al. Diphenyl Diselenide-Induced Seizures in Rat Pups: Possible Interaction with Glutamatergic System. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 6, p. 996-1004, 2007.

PURSER, S. et al. Fluorine in medicinal chemistry. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 2, p. 320-330, 2008.

QAMAR, N. et al. Emerging role of selenium in treatment of rheumatoid arthritis: An insight on its antioxidant properties. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 66, p. 126737, 2021.

QUINES, C. B. et al. Homeostatic effect of p-chloro-diphenyl diselenide on glucose metabolism and mitochondrial function alterations induced by monosodium glutamate administration to rats. **Amino Acids**, v. 48, n. 1, p. 137-148, 2015.

QUINES, C. B. et al. Diphenyl diselenide elicits antidepressant-like activity in rats exposed to monosodium glutamate: A contribution of serotonin uptake and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity. **Behavioural Brain Research**, v. 301, p. 161-167, 2016.

QUINES, C. B. et al. (p-CIPhSe)<sub>2</sub> stabilizes metabolic function in a rat model of neuroendocrine obesity induced by monosodium glutamate. **Food and Chemical Toxicology**, v. 118, p. 168-180, 2018.

RADÁK, Z. et al. Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 7-8, p. 1059-1063, 1999.

RAMOS-NINO, M. E. The Role of Chronic Inflammation in Obesity-Associated Cancers. **ISRN Oncology**, v. 2013, p. 1-25, 2013.

RAUBER, F. et al. Consumption of ultra-processed food products and its effects on children's lipid profiles: A longitudinal study. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 25, n. 1, p. 116-122, 2015.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, n. 9822, p. 1256-1268, 2012.

RAYMAN, M. P. et al. Association between regional selenium status and reported outcome of COVID-19 cases in China. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 111, n. 6, p. 1297-1299, 2020.

REN, J. et al. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Journal of Molecular Medicine**, v. 88, n. 10, p. 993-1001, 2010.

RITOV, V. B. et al. Deficiency of Subsarcolemmal Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 8-14, 2004.

RODGERS, R. J. et al. Anti-obesity drugs: past, present and future. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, n. 5, p. 621-626, 2012.

ROSA, S. G. et al. m-Trifluoromethyl-diphenyl diselenide promotes resilience to social avoidance induced by social defeat stress in mice: Contribution of opioid receptors and MAPKs. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 82, p. 123-135, 2018.

ROSA, S. G. et al. Opioid system contribution to the antidepressant-like action of m-trifluoromethyl-diphenyl diselenide in mice: A compound devoid of tolerance and withdrawal syndrome. **Journal of Psychopharmacology**, v. 31, n. 9, p. 1250-1262, 2017.

ROSA, S. G. et al. Antinociceptive action of diphenyl diselenide in the nociception induced by neonatal administration of monosodium glutamate in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 758, p. 64-71, 2015.

ROSA, S. G. et al. Diphenyl diselenide ameliorates monosodium glutamate induced anxiety-like behavior in rats by modulating hippocampal BDNF-Akt pathway and uptake of GABA and serotonin neurotransmitters. **Physiology & Behavior**, v. 155, p. 1-8, 2016.

ROSINI, T. C. et al. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 383-387, 2012.

ROTRUCK, J. T. et al. Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. **Science**, v. 179, n. 4073, p. 588-590, 1973.

SAAB, B. J.; MANSUY, I. M. Neuroepigenetics of memory formation and impairment: The role of microRNAs. **Neuropharmacology**, v. 80, p. 61-69, 2014.

SALIM, S. Oxidative Stress and the Central Nervous System. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 360, n. 1, p. 201-205, 2017.

SARTORI, G. et al. Antiviral Action of Diphenyl Diselenide on Herpes Simplex Virus 2 Infection in Female BALB/c Mice. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, n. 7, p. 1638-1648, 2016.

SAVEGNAGO, L. et al. Structural modifications into diphenyl diselenide molecule do not cause toxicity in mice. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 27, n. 2, p. 271-276, 2009.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. D. 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.

SCHWEIZER, U. et al. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. **Brain Research Reviews**, v. 45, n. 3, p. 164-178, 2004.

SEALE, L. A. et al. Disruption of the Selenocysteine Lyase-Mediated Selenium Recycling Pathway Leads to Metabolic Syndrome in Mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 20, p. 4141-4154, 2012.

SEMPLE, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, v. 106-107, p. 1-16, 2013.

SHA, H. et al. The Anti-Inflammatory and Anti-Oxidant Mechanisms of the Keap1/Nrf2/ARE Signaling Pathway in Chronic Diseases. **Aging and disease**, v. 10, n. 3, p. 637, 2019.

SHASTRI, A. et al. Innate Immunity and Neuroinflammation. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1-19, 2013.

SHOEMAKER, L. N. et al. Swimming-related effects on cerebrovascular and cognitive function. **Physiological Reports**, v. 7, n. 20, 2019.

SIERRA, A. et al. Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 4, p. 483-495, 2010.

SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 453-462, 2009.

SILVA, W. J. M. D.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 14, n. 3, p. 441-451, 2011.

SOARES DE OLIVEIRA, A. R. et al. Selenium status and oxidative stress in obese: Influence of adiposity. **European Journal of Clinical Investigation**, 2021.

SPEIRS, C. K. et al. Harnessing the cell death pathway for targeted cancer treatment. **American Journal of Cancer Research**, v. 1, n. 1, p. 43-61, 2011.

SQUIRE, L. R. et al. Memory consolidation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 8, p. a021766, Aug 3 2015.

STEINBRENNER, H.; SIES, H. Selenium homeostasis and antioxidant selenoproteins in brain: Implications for disorders in the central nervous system. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 536, n. 2, p. 152-157, 2013.

STONE, V. et al. Swimming exercise enhances the hippocampal antioxidant status of female Wistar rats. **Redox Report**, v. 20, n. 3, p. 133-138, 2014.

STRANAHAN, A. M. et al. Diet-induced elevations in serum cholesterol are associated with alterations in hippocampal lipid metabolism and increased oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v. 118, n. 4, p. 611-615, 2011.

SUN, M. et al. Dietary Cocoa Ameliorates Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Increases Markers of Antioxidant Response and Mitochondrial Biogenesis in High Fat-Fed Mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, p. 108618, 2021.

SUZUKI, M. et al. Overview of redox regulation by Keap1–Nrf2 system in toxicology and cancer. **Current Opinion in Toxicology**, v. 1, p. 29-36, 2016.

TAHERI, M. et al. A Review on the Serum Electrolytes and Trace Elements Role in the Pathophysiology of COVID-19. **Biological Trace Element Research**, 2020.



TAO, L. et al. Dexmedetomidine ameliorates high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease by targeting SCD1 in obesity mice. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 9, n. 1, 2020.

TAVARES, L. F. et al. Relationship between ultra-processed foods and metabolic syndrome in adolescents from a Brazilian Family Doctor Program. **Public Health Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 82-87, 2011.

TE MORENGA, L. et al. Dietary sugars and body weight: systematic review and meta-analyses of randomised controlled trials and cohort studies. **British Medical Journal**, v. 346, n. jan15 3, p. e7492-e7492, 2013.

TIAN, B. et al. Anthocyanins from the fruits of *Lycium ruthenicum* Murray improve high-fat diet-induced insulin resistance by ameliorating inflammation and oxidative stress in mice. **Food & Function**, 2021.

TINGGI, U. Selenium: its role as antioxidant in human health. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 13, n. 2, p. 102-108, 2008.

TSCHÖP, M.; HEIMAN, M. Rodent obesity models: An overview. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 109, n. 06, p. 307-319, 2001.

UPADHYAY, D. et al. Particulate Matter Induces Alveolar Epithelial Cell DNA Damage and Apoptosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 180-187, 2003.

VANDEVIJVERE, S. et al. Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic: a global analysis. **Bull World Health Organ**, v. 93, n. 7, p. 446-56, Jul 1 2015.

VASCONCELOS, T. M. D. et al. Evolução da ingestão de energia e nutrientes de adolescentes de escolas públicas de Niterói, Rio de Janeiro, Brasil, 2003-2008. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 8, 2016.

VELOSO, I. C. et al. A selanylimidazopyridine (3-SePh-IP) reverses the prodepressant- and anxiogenic-like effects of a high-fat/high-fructose diet in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, n. 5, p. 673-681, 2021.

VIÑA, J. et al. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 14, p. 1369-1374, 2009.

VINET, J. et al. Neuroprotective function for ramified microglia in hippocampal excitotoxicity. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, n. 1, 2012.

VOLTARELLI, F. A. et al. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 11, p. 1389-1394, 2002.

VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Assessing Spatial Learning and Memory in Rodents. **ILAR Journal**, v. 55, n. 2, p. 310-332, 2014.

VOTRUBA, S. B. et al. Ultra-Processed Food Products and Obesity in Brazilian Households (2008–2009). **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e92752, 2014.

WALKER, R. W. et al. Fructose content in popular beverages made with and without high-fructose corn syrup. **Nutrition**, v. 30, n. 7-8, p. 928-35, Jul-Aug 2014.

WANG, S. et al. Correlation between mouse age and human age in anti-tumor research: Significance and method establishment. **Life Sciences**, v. 242, p. 117242, 2020a.

WANG, X. et al. Diphenyl diselenide ameliorates diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats via suppressing oxidative stress and inflammation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 338, p. 109427, 2021.

WANG, X. et al. Differential effect of Se on insulin resistance: regulation of adipogenesis and lipolysis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 415, n. 1-2, p. 89-102, 2016.

WANG, X. et al. The effect of swimming exercise and diet on the hypothalamic inflammation of ApoE<sup>-/-</sup> mice based on SIRT1-NF- $\kappa$ B-GnRH expression. **Ageing**, v. 12, n. 11, p. 11085-11099, 2020b.

WANG, Y.-S. et al. Se Deficiency Induced Inflammation Resulting to a Diminished Contraction of the Small Intestinal Smooth Muscle in Mice. **Biological Trace Element Research**, v. 199, n. 4, p. 1437-1444, 2020c.

WÄRNBERG, J. et al. Nutrition, Inflammation, and Cognitive Function. **Annals of the New York Academy of Sciences.**, v. 1153, n. 1, p. 164-175, 2009.

WHITE, P. A. S. et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 57, n. 5, p. 339-345, 2013.

WHITMER, R. A. et al. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. **British Medical Journal**, v. 330, n. 7504, p. 1360, Jun 11 2005.

XU, L. et al. Swertiamarin supplementation prevents obesity-related chronic inflammation and insulin resistance in mice fed a high-fat diet. **Adipocyte**, v. 10, n. 1, p. 160-173, 2021.

YAFFE, K. The Metabolic Syndrome, Inflammation, and Risk of Cognitive Decline. **Jama**, v. 292, n. 18, p. 2237, 2004.

YANG, Y. et al. Edaravone Alleviated Propofol-Induced Neurotoxicity in Developing Hippocampus by mBDNF/TrkB/PI3K Pathway. **Drug Design, Development and Therapy**, v. Volume 15, p. 1409-1422, 2021.

YOSHIZAKI, K. et al. High-Fat Diet Enhances Working Memory in the Y-Maze Test in Male C57BL/6J Mice with Less Anxiety in the Elevated Plus Maze Test. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 2036, 2020.

YU, M. et al. High mobility group box-1 mediates hippocampal inflammation and contributes to cognitive deficits in high-fat high-fructose diet-induced obese rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 82, p. 167-177, 2019.

YUE, J.; LÓPEZ, J. M. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2346, 2020.

ZAMBON, L. et al. Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 5, p. 707-715, 2009.

ZBOROWSKI, V. A. et al. (p-CIPhSe)<sub>2</sub> modulates hippocampal BDNF/TrkB signaling and reverses memory impairment induced by diabetes in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 94, p. 109660, 2019a.

ZBOROWSKI, V. A. et al. Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway contributes to p-chlorodiphenyl diselenide antidepressant-like action in diabetic mice. **Psychopharmacology**, v. 237, n. 2, p. 363-374, 2019b.

ZHANG, L. et al. Selenium Regulation of the Immune Function of Dendritic Cells in Mice Through the ERK, Akt and RhoA/ROCK Pathways. **Biological Trace Element Research**, 2020.

ZHANG, Z. et al. FOS/GOS attenuates high-fat diet induced bone loss via reversing microbiota dysbiosis, high intestinal permeability and systemic inflammation in mice. **Metabolism**, p. 154767, 2021.

ZHAO, B. et al. Rutaecarpine Ameliorated High Sucrose-Induced Alzheimer's Disease Like Pathological and Cognitive Impairments in Mice. **Rejuvenation Research**, 2020.

ZHAO, Z. et al. Obesity caused by a high-fat diet regulates the Sirt1/PGC-1 $\alpha$ /FNDC5/BDNF pathway to exacerbate isoflurane-induced postoperative cognitive dysfunction in older mice. **Nutritional Neuroscience**, v. 23, n. 12, p. 971-982, 2019.

ZHUANG, J. et al. Purple sweet potato color protects against high-fat diet-induced cognitive deficits through AMPK-mediated autophagy in mouse hippocampus. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 65, p. 35-45, 2019.



## ANEXOS

**Anexo A** - Carta de aprovação do projeto de pesquisa Avaliação da ação do exercício de natação em reverter o dano cognitivo induzido pela administração de substâncias hipercalóricas em camundongos pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)



Comissão de Ética no Uso de Animais  
da  
Universidade Federal de Santa Maria

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO EXERCÍCIO DE NATAÇÃO EM REVERTER O DANO COGNITIVO INDUZIDO PELA ADMINISTRAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS HIPERCALÓRICAS EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 7134140318 (ID 001999), sob a responsabilidade de **Cristina Wayne Nogueira e equipe; Natália da Silva Jardim; Sabrina Grendene Muller; Flávia Matos Pase** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 07/06/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE ACTION OF THE SWIMMING EXERCISE IN REVERTER THE COGNITIVE DAMAGE INDUCED BY THE ADMINISTRATION OF AL HIPERCALORIC SUBSTANCES IN MICE", utilizing 232 Heterogenics mice (116 males and 116 females), protocol number CEUA 7134140318 (ID 001999), under the responsibility of **Cristina Wayne Nogueira and team; Natália da Silva Jardim; Sabrina Grendene Muller; Flávia Matos Pase** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 06/07/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 05/2018 a 05/2019

Área: **Bioquímica E Biologia Molecular**

Origem:	Biotério Central UFSM			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	idade: 21 a 21 dias N: 116
Linhagem:	Swiss			Peso: 10 a 15 g
Origem:	Biotério Central UFSM			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	idade: 21 a 21 dias N: 116
Linhagem:	Swiss			Peso: 10 a 15 g

Local do experimento: Sala 2424- Prédio 18 e Sala 3209- Prédio 19. Durante todo o curto período em que os animais estarão em nossa sala de experimentação laboratorial, a limpeza e a troca das palhas de cada uma das caixas serão efetuadas por um funcionário, sendo que, o mesmo está devidamente treinado para realizar o procedimento, causando o mínimo possível de desconforto para os animais experimentais

Santa Maria, 27 de janeiro de 2021

Profa. Dra. Patrícia Severo do Nascimento  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria



**Anexo B** - Carta de aprovação do projeto de pesquisa Efeito do disseleneto *m*-trifluormetil difenila contra o dano na memória e aprendizagem induzidos por uma dieta modificada na sua composição de lipídeos/carboidratos em camundongos jovens machos e fêmeas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do disseleneto de bis-(*m*-trifluormetil-difenila) contra o dano na memória e aprendizagem induzidos por uma dieta modificada na sua composição de lipídeos/carboidratos em camundongos jovens machos e fêmeas.", protocolada sob o CEUA nº 8990220420 (ID 003045), sob a responsabilidade de **Cristina Wayne Nogueira e equipe; Natalia da Silva Jardim; Sabrina Grendene Müller** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 02/06/2020.

We certify that the proposal "Effect of *m*-trifluormetildiphenyl diselenide on memory and learning damage induced by a fat/carbohydrate modified diet in young male and female mice.", utilizing 64 Heterogenics mice (32 males and 32 females), protocol number CEUA 8990220420 (ID 003045), under the responsibility of **Cristina Wayne Nogueira and team; Natalia da Silva Jardim; Sabrina Grendene Müller** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 06/02/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2020](#) a [08/2022](#)

Área: [Departamento de Bioquímica E Biologia Molecular](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [21 a 23 dias](#)

N: [32](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [10 a 16 g](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [21 a 23 dias](#)

N: [32](#)

Linhagem: [Swiss](#)

Peso: [10 a 16 g](#)



Local do experimento: Comportamentos na sala 3209- Prédio 19; e eutanásia na Sala 3206- Prédio 17. O transporte dos animais ao local adequado para as atividades experimentais seguirá os seguintes cuidados: I- O transporte será realizado, preferencialmente, antes das 10h da manhã. Evitando o transporte nos horários de pico de temperatura e tráfego intenso; II- Os animais serão levados diretamente até seu destino final, a fim de minimizar o estresse a que serão submetidos neste momento; III - Os animais serão acondicionados em caixas apropriadas para o transporte, as quais permitem que os mesmos se movimentem confortavelmente e proporcionem travamento adequado para impedir fugas, garantindo a segurança destes, do usuário e do meio ambiente; IV- As caixas de transporte serão previamente higienizadas e preparadas com cama apropriada, bem como estarão devidamente identificadas; V- Por questões de segurança a caixa de transporte estará sempre coberta com material que permita ventilação e impeça que os animais possam ser observados durante o percurso; VI- Antes do transporte os bebedouros serão retirados para evitar vazamentos;

Santa Maria, 27 de janeiro de 2021


Prof. Dra. Patrícia Severo do Nascimento  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

**Anexo C** - Autorização para reprodução do artigo científico intitulado: Nuclear Factor [Erythroid-derived 2]-like 2 and Mitochondrial Transcription Factor A Contribute to Moderate-intensity Swimming Effectiveness against Memory Impairment in Young Mice Induced by Concomitant Exposure to a High-calorie Diet during the Early Life Period.

Home
Help
Email Support
Sign in
Create Account



**Nuclear Factor [Erythroid-derived 2]-like 2 and Mitochondrial Transcription Factor A Contribute to Moderate-intensity Swimming Effectiveness against Memory Impairment in Young Mice Induced by Concomitant Exposure to a High-calorie Diet during the Early Life Period**

Author: Natália Silva Jardim, Sabrina Grendene Müller, Flávia Matos Pase, Cristina Wayne Nogueira

Publication: Neuroscience

Publisher: Elsevier

Date: 1 January 2021

© 2020 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Journal Author Rights**

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK
CLOSE WINDOW

© 2021 Copyright - All Rights Reserved | Copyright Clearance Center, Inc. | [Privacy statement](#) | [Terms and Conditions](#)  
Comments? We would like to hear from you. E-mail us at [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com)