

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

**AÇÃO NEUROPROTETORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO  
DISSELENETO DE DIFENILA E EXERCÍCIO DE NATAÇÃO  
EM MODELO DE ENVELHECIMENTO EM RATOS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Marlon Régis Leite**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2016**

# **AÇÃO NEUROPROTETORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO DISSELENETO DE DIFENILA E EXERCÍCIO DE NATAÇÃO EM MODELO DE ENVELHECIMENTO EM RATOS**

**Marlon Régis Leite**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS) como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Bioquímica Toxicológica**.

**Orientador: Prof. Dr. Gilson Rogério Zeni**  
**Co-orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Wayne Nogueira**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Leite, Marlon Régis

Ação neuroprotetora e anti-inflamatória do disseleneto de difenila e exercício de natação em modelo de envelhecimento em ratos / Marlon Régis Leite.-2016.  
85 p.; 30cm

Orientador: Gilson Rogério Zeni

Coorientador: Cristina Wayne Nogueira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica, RS, 2016

1. Envelhecimento 2. Inflamação 3. Hipotálamo 4. Selênio 5. Exercício I. Zeni, Gilson Rogério II. Nogueira, Cristina Wayne III. Título.

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado

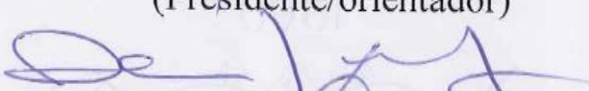
**AÇÃO NEUROPROTETORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO  
DISSELENETO DE DIFENILA E EXERCÍCIO DE NATAÇÃO EM  
MODELO DE ENVELHECIMENTO EM RATOS**

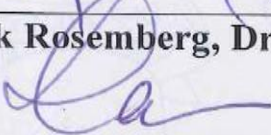
elaborada por  
**Marlon Régis Leite**


como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutor em Bioquímica Toxicológica**

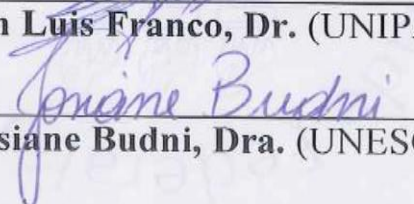
**COMISSÃO EXAMINADORA:**

  
**Gilson Rogério Zeni**  
(Presidente/orientador)

  
**Denis Broock Rosenberg, Dr. (UFSM)**

  
**Felipe Pivetta Carpes, Dr. (UNIPAMPA)**

  
**Jeferson Luis Franco, Dr. (UNIPAMPA)**

  
**Josiane Budni, Dra. (UNESC)**

Santa Maria, 29 de janeiro de 2016.

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha mãe e irmãs por quem tenho um grande carinho e ao meu pai e vó onde eles estiverem.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço a Deus por permitir que eu chegasse até esta etapa e pelo conhecimento que adquiri todos estes anos.*

*A minha mãe e irmãs pelos bons momentos e por sempre me apoiarem nas horas difíceis da minha vida.*

*Aos meus orientadores Prof. GZ e Prof<sup>ra</sup> Cristina dois exemplos a serem seguidos devido a sua dedicação, profissionalismo, compreensão e companheirismo. Sem seu auxílio eu não teria alcançado esta etapa e muito menos as próximas etapas que se seguirão.*

*Aos professores Mauro Schneider Oliveira e Elgion Lucio da Silva Loreto e alunos pela amizade e auxílio que permitiu a concretização desta tese.*

*A todos os alunos do Prof. Luís Fernando pela amizade e pelo auxílio.*

*Aos colegas do Lab, Carol, Carolzinha, Vini, Bruna, Gláubia, Dani, Fran, Vavá, Suelen, Carla, Sabrina, Pietro, Suzan e Ana Paula, pelos diversos momentos que compartilhamos. Aos antigos colegas do lab, Marina, Cristiane, Cristiani, Cristiano, Aninha, Ethel, Juliana, Lucielli, Tuka, Silvane, Carmine e Ricardo que sempre estiveram dispostos a ajudar quando necessário.*

*Um agradecimento especial ao Zé Cechella, Simone e Nati, a quem devo muito a concretização desta tese e pela a grande amizade.*

*Aos colegas César, Fernando, Marcel e Rogério por quem tenho uma imensa amizade.*

*Aos colegas do Lab GZ, pelos bons momentos passados em todos esses anos de laboratório.*

*Aos professores Josiane, Jeferson, Denis e Felipe, pela disponibilidade de avaliarem esta tese.*

*Ao Rinaldo, pela amizade e por cuidar dos nossos animais.*

*Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação.*

*À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, por possibilitarem a realização do doutorado.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.*

*“Insanidade é continuar fazendo  
sempre as mesmas coisas e esperar  
encontrar resultados diferentes”*

*Albert Einstein*

## RESUMO

Tese de Doutorado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

### **AÇÃO NEUROPROTETORA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO DISSELENETO DE DIFENILA E EXERCÍCIO DE NATAÇÃO EM MODELO DE ENVELHECIMENTO EM RATOS**

AUTOR: MARLON RÉGIS LEITE

ORIENTADOR: GILSON ROGÉRIO ZENI

CO-ORIENTADOR: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA

Local e data de defesa: Santa Maria, 29 de janeiro de 2016.

O envelhecimento é um processo degenerativo que afeta praticamente todos os organismos vivo. O aumento do processo inflamatório parece ser um dos principais fatores que contribuem para o envelhecimento e o inflammaging bem como a neuroinflamação no hipotálamo tem um papel crítico. Assim essa tese teve como objetivo principal avaliar os efeitos de uma dieta suplementada com disseleneto de difenila (PhSe)<sub>2</sub> e exercício de natação sobre alterações ocasionadas pelo envelhecimento tanto no sangue quanto no hipotálamo de ratos Wistar velhos (27 meses de idade). Para o estudo 1, os animais foram suplementados com (PhSe)<sub>2</sub> (10 p.p.m.) na ração e realizaram exercício de natação com sobrecarga (3% do peso corporal, 20 min/dia, 5 dias por semana). Tanto a suplementação com (PhSe)<sub>2</sub> quanto o exercício de natação tiveram a duração de 4 semanas. Amostras de sangue foram coletadas para a análise dos níveis de interleucinas pró e anti-inflamatórias. Os resultados apresentados no primeiro estudo demonstraram claramente os efeitos anti-inflamatórios do (PhSe)<sub>2</sub> e do exercício de natação uma vez que os níveis de citocinas pró-inflamatórias séricas foram diminuídos em ratos de diferentes idades (meia idade e velhos). Além disso, os níveis da proteína anti-inflamatória IL-10 foram aumentados. No entanto ratos velhos que realizaram somente o exercício de natação tiveram os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias aumentados e da IL-10 diminuídos, demonstrando que o protocolo de exercício de natação utilizado foi exaustivo para os animais. Não houve nenhuma modificação nos parâmetros avaliados no sangue de ratos velhos suplementados somente com (PhSe)<sub>2</sub>. Estes resultados demonstram que os efeitos da dieta suplementada com (PhSe)<sub>2</sub> e do exercício de natação nos níveis séricos de citocinas pró e anti-inflamatórias foram dependentes da idade dos animais. Para o estudo 2, os animais receberam a suplementação com (PhSe)<sub>2</sub> similarmente ao estudo 1 (10 p.p.m. na ração). Contudo, tendo em vista os efeitos pró-inflamatórios do exercício de natação observados no estudo 1, a sobrecarga utilizada foi reduzida (1% do peso corporal, 20 min/dia, 5 dias por semana). Novamente, ambas a suplementação com (PhSe)<sub>2</sub> e exercício de natação tiveram a duração de 4 semanas. O ensaio de western blotting foi realizado para avaliar os níveis de proteínas envolvidas com ativação de células gliais, apoptose e neuroproteção. Além disso, o ensaio de imunohistoquímica foi realizado para confirmar a ativação de astrocitos. No segundo estudo, uma diminuição nos níveis de marcadores de ativação de células gliais (GFAP e IBA-1) foi observada no hipotálamo de ratos velhos suplementados com (PhSe)<sub>2</sub> e que realizavam exercício de natação. Além disso, a fosfoliralação da JNK, uma quinase envolvida com a resposta inflamatória e apoptose, foi diminuída. Um efeito antiapoptótico por parte da suplementação com (PhSe)<sub>2</sub> e exercício de natação foi observado uma vez que os níveis de NeuN foram aumentados bem como da proteína anti-apoptótica Bcl2 no hipotálamo de ratos velhos. Reforçando este efeito anti-apoptótico, os níveis de pró-caspase 3 e PARP clivada foram aumentados e diminuídos respectivamente. Um aumento dos níveis BDNF maduro e Akt forforilada, duas proteínas envolvidas com a sobrevivência celular, foram aumentados pela suplementação com (PhSe)<sub>2</sub> e exercício de natação. Estes resultados demonstram os efeitos benéficos da suplementação com (PhSe)<sub>2</sub> e exercício de natação sobre modificações ocasionadas pelo envelhecimento.

**Palavras-chave:** Envelhecimento. Inflamação. Hipotálamo. Selênio. Exercício.



## **ABSTRACT**

Doctor Course Thesis  
Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry  
Federal University of Santa Maria

### **NEUROPROTECTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTION OF DIPHENYL DISELENIDE AND SWIMMING EXERCISE IN AGING MODEL IN RATS**

**AUTHOR: MARLON RÉGIS LEITE**  
**ADVISOR: GILSON ROGÉRIO ZENI**  
**CO-ADVISOR: CRISTINA WAYNE NOGUEIRA**

Date and place of defense: Santa Maria, January 29, 2015.

Aging is a degenerative process that affects virtually all living organisms. The increase in the inflammatory process seems to be one of the main factors that contribute to aging and inflammaging and neuroinflammation in the hypothalamus plays a critical role. This way, the objective of this study was to investigate the effects of a supplemented diet with diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise on changes caused by aging in both blood and hypothalamus of old Wistar rats (27 months). For the first study, the animals were supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> (1 ppm) in the diet and performed swimming exercise with overload (3% body weight, 20 min / day, 5 days per week). Both (PhSe)<sub>2</sub> supplementation as the swimming exercise lasted four weeks. Blood samples were collected for analysis of levels of interleukins pro- and anti-inflammatory. The results of the first study clearly demonstrated the anti-inflammatory effects of (PhSe)<sub>2</sub> plus swimming exercise because the serum levels of pro-inflammatory cytokines were decreased in rats of different ages (middle age and old). Furthermore, the anti-inflammatory protein IL-10 was increased in serum of rats of different ages. However old rats that underwent only swimming exercise increased serum levels of proinflammatory cytokines and IL-10 was decreased, suggesting that the swimming exercise protocol was exhaustive for these animals. There was no change in blood of old rats supplemented only with (PhSe)<sub>2</sub>. These results demonstrated that a diet supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise affected serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines dependent of age of the animals. For the second study, animals received supplementation (PhSe)<sub>2</sub> similarly to first study (1 ppm). However, in view of the pro-inflammatory effects of swimming exercise observed in the first study, the overhead used was reduced (1% of body weight, 20 min / day, 5 days per week). Again, both supplementation with (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise lasted 4 weeks. The Western blotting assay was performed to evaluate the levels of proteins involved in the activation of glial cells, apoptosis and neuroprotection. Furthermore, the immunohistochemical assay was performed to confirm the activation of astrocytes. In the second study, a decrease in the levels of glial cell activation markers (GFAP and IBA-1) was observed in the hypothalamus of aged rats supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> and that performed swimming exercise. Furthermore, JNK phosphorylation, a kinase involved in the inflammatory response and apoptosis, was decreased. An anti-apoptotic effect by the supplementation with (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise was observed since the levels of NeuN were increased as well as anti-apoptotic protein Bcl2 in the hypothalamus of old rats. Reinforcing this anti-apoptotic effect, the levels of pro-caspase-3 and cleaved PARP were increased and decreased respectively. Increased levels of mature BDNF and phosphorylated Akt, two proteins involved in cell survival, were increased by supplementation with (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise. These results demonstrated the beneficial effects of supplementation (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise on age-related changes.

**Keywords:** Aging. Inflammation. Hypothalamus. Selenium. Exercise.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

### INTRODUÇÃO

Figura 1	Os nove marcadores e possíveis causas do envelhecimento.	12
Figura 2	Representação esquemática da inter-relação entre inflamação hipotalâmica e envelhecimento sistêmico	21
Figura 3	Alguns efeitos do exercício físico sobre os nove marcadores envolvidos com o processo de envelhecimento	23
Figura 4	Estrutura química do (PhSe) <sub>2</sub> .	27

### DISCUSSÃO

Figura 5	Modelo esquemático dos possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos do (PhSe) <sub>2</sub> e exercício de natação no sangue e hipotálamo de ratos velhos.	67
----------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(PhSe) <sub>2</sub>	Disseleneto de difenila
AMPK	Quinase dependente de AMP
AP-1	Proteína ativadora
Akt	Serine/threonine protein kinase
Bad	Do inglês sinal de morte associado ao Bcl2
Bax	Do inglês proteína X associada ao Bcl2
Bcl2	Do inglês B-cell lymphoma 2
BCL-X <sub>L</sub>	Do inglês B-cell lymphoma-extra large
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Bim	Proteína 11 semelhante ao Bcl2
CBP	Proteína de ligação a CREB
COX	Ciclooxigenase
CREB	Elemento de resposta ao AMP cíclico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ER	Espécies reativas
FOXO	Do inglês forkhead box O
GFAP	Proteína acídica fibrilar glial
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina-1
IBA-1	Molécula adaptadora de ligação a cálcio ionizado-1
IL	Interleucinas
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
JNK	Do inglês C-Jun N-terminal kinase
LOX	Lipooxigenase
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
mTOR	Do inglês mammalian target of rapamycin
NeuN	Proteína neuronal nuclear
NF-κB	Fator de transcrição κB
PARP	Do inglês poly ADP ribose polymerase
p38 MAPK	MAP quinases p38
PGC-1α	Do inglês Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K	Fosfatidilinositol-3-kinase
PLCγ	Fosfoinositideo fosfolipase C-γ
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 ENVELHECIMENTO .....</b>	<b>11</b>
1.1.1. Fatores causadores do envelhecimento .....	12
1.1.1.1 Instabilidade Genômica.....	12
1.1.1.2 Encurtamento dos telômeros .....	13
1.1.1.3 Alterações epigenéticas .....	13
1.1.1.4 Perda de Proteostase.....	14
1.1.1.5 Sensibilidade desregulada a nutrientes .....	14
1.1.1.6 Disfunção mitocondrial .....	15
1.1.1.7 Senescência celular .....	16
1.1.1.8 Exaustão de células tronco .....	16
1.1.1.9 Comunicação intercelular alterada .....	17
<b>1.2 IMUNOSENESCÊNCIA, "INFLAMMAGING" E O PAPEL DO HIPOTÁLAMO NO ENVELHECIMENTO .....</b>	<b>17</b>
<b>1.3. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O ENVELHECIMENTO.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 EFEITOS DO SELÊNIO SOBRE IMUNIDADE, RESPOSTA ANTIOXIDANTE E ENVELHECIMENTO .....</b>	<b>25</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>2.1. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>28</b>
<b>3. ARTIGO.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 ARTIGO 1: Swimming exercise and diphenyl diselenide-supplemented diet affect the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines differently depending on the age of rats .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 MANUSCRITO 1: .....</b>	<b>36</b>
ABSTRACT.....	37
1. INTRODUCTION .....	38
2. MATERIALS AND METHODS .....	39
2.1 Animals .....	39
2.2 Drugs.....	39
2.3. Experimental procedure .....	40
2.4 . Dietary supplementation .....	40
2.5 Exercise training protocol .....	40
2.6 Immunohistochemistry assay .....	41
2.7 Western blot assay.....	41
2.8 Statistical Analysis .....	42
3. RESULTS .....	42
3.1 (PhSe) <sub>2</sub> and swimming exercise decrease the levels of markers of glial cells activated in the hypothalamus of old rats .....	43
3.2. (PhSe) <sub>2</sub> and swimming exercise decrease the levels of proteins involved in the apoptosis and decrease the pJNK/JNK ratio in the hypothalamus of old rats .....	43
3.3 (PhSe) <sub>2</sub> and swimming exercise increase the levels of proteins involved in neuroprotection in the hypothalamus of old rats .....	44
4. DISCUSSION .....	45
REFERENCES .....	48
LEGENDS AND FIGURES .....	53
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>

## APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma breve revisão sobre os temas abordados nesta tese seguida pelos itens **OBJETIVOS**.

O desenvolvimento desta tese está apresentado sob a forma de um artigo científico e um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. Os artigos estão dispostos da mesma forma em que foram publicados ou organizados para a submissão. Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES** encontrados no final desta tese apresentam interpretações gerais sobre o manuscrito e resultados complementares contidos neste trabalho. O item **REFERÊNCIAS** refere-se somente as citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** e **DISCUSSÃO** desta tese.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ENVELHECIMENTO

O envelhecimento tem despertado a curiosidade e tem impelido pesquisas ao longo da história da humanidade. Este fenômeno é definido como um declínio funcional dependente do tempo de vários sistemas que coordenam a homeostase dos organismos vivos acarretando mudanças fisiológicas, físicas e no caso dos humanos sociais (De Luca dAlessandro et al., 2011). Com a melhora na saúde pública, tecnologias médicas e nutrição; adultos com mais de 50 anos tornaram-se o segmento que mais cresce da sociedade (Burch et al., 2014) e as estimativas preveem que o mundo terá cerca de 2 bilhões de idosos em 2050. No entanto, em pessoas idosas, os déficits relacionados à saúde degenerativa começam a aparecer e representam um potencial de carga econômica para o indivíduo e a sociedade.

Um grande avanço nas pesquisas do envelhecimento ocorreu no início dos anos 60, quando Leonard Hayflick mostrou que as células cultivadas *in vitro* têm uma vida útil limitada, um processo geralmente referido como senescência celular (Hayflick and Morehead, 1961). A senescência celular pode ser mais bem definida como uma repressão estável do ciclo celular acoplado a mudanças fenotípicas estereotipadas que provocam uma série de alterações metabólicas e morfológicas e que, eventualmente, fazem com que a célula cesse a divisão. Novos avanços nas pesquisas a cerca do envelhecimento ocorreram nos últimos 30 anos após o isolamento das primeiras linhagens de *Caenorhabditis elegans* com vida longa (Klass, 1983). Desde então, várias questões críticas surgiram no campo do envelhecimento sobre as fontes fisiológicas de danos causadores do envelhecimento, as respostas compensatórias que tentam restabelecer a homeostase, a interligação entre os diferentes tipos de danos e respostas compensatórias e as possibilidades de intervir exogenamente para retardar o envelhecimento.

Recentemente, foram propostas nove causas principais que são geralmente consideradas por contribuir para o processo de envelhecimento, determinado assim o fenótipo do envelhecimento (Figura 1) (López-Otín et al., 2013). Dos nove marcadores propostos por Lopez-Otin, a instabilidade genética, encurtamento dos telômeros, perda de proteostase e exaustão de células-tronco são principalmente geneticamente pré-determinados. Alterações epigenéticas, sensibilidade desregulada a nutrientes, senescência celular, disfunção mitocondrial e comunicação intercelular alterada têm sua fonte primária no estilo de vida e influência do meio ambiente (Chen et al., 2015).



Figura 1. Os nove marcadores e possíveis causas do envelhecimento. Fonte adaptada: López-Otín et al., 2013.

### 1.1.1. Fatores causadores do envelhecimento

#### 1.1.1.1 Instabilidade Genômica

Uma característica comum do envelhecimento é o acúmulo de danos genéticos ao longo da vida (Moskalev et al., 2012). A integridade e a estabilidade de ambos DNA mitocondrial e nuclear são continuamente desafiadas por agentes exógenos físicos químicos e biológicos além de ameaças endógenas tais como erros de replicação de DNA, reações hidrolíticas espontâneas e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Hoeijmakers, 2009). As lesões genéticas decorrentes de danos extrínsecos ou intrínsecos são muito diversas ocasionando uma frequência elevada de mutações genéticas que incluem mudanças nas sequências de ácidos nucleicos, rearranjos cromossômicos (mutações pontuais, translocações, ganhos e perdas cromossomais), aneuploidia (presença anormal de cromossomos em uma célula), encurtamento dos telômeros e perturbações genéticas. Para minimizar lesões

provocadas por agentes intrínsecos ou extrínsecos, uma complexa rede de mecanismos de reparo foi desenvolvida nos organismo durante o processo evolutivo permitindo combater a maioria dos danos infligidos ao DNA (Lord and Washword). Contudo, as deficiências genéticas nas vias de reparo ao DNA são outra característica marcante em organismos envelhecidos (Moskalev et al., 2012). Os sistemas de estabilidade genômica também incluem mecanismos específicos para manter o comprimento apropriado e funcionalidade dos telômeros e para assegurar a integridade do DNA mitocondrial (mtDNA) (Blackburn et al., 2006; Kazak et al., 2012). Outro fator de extrema importância para a instabilidade genômica são defeitos na arquitetura nuclear, conhecidos como laminopatias (Worman, 2012).

#### *1.1.1.2 Encurtamento dos telômeros*

O acúmulo de danos do DNA com a idade parece afetar o genoma aleatoriamente, mas existem algumas regiões existentes nos cromossomos, tais como telômeros, que são particularmente susceptíveis a deterioração relacionada com a idade (Blackburn et al., 2006). Telômeros são regiões nas extremidades dos cromossomos que possuem sequência de nucleotídeos repetidos. Os telômeros protegem as regiões codificantes dos cromossomos da deterioração ou da fusão com cromossomos vizinhos. As DNAs polimerases replicativas não têm a capacidade de replicar completamente as extremidades terminais das moléculas lineares de DNA, uma função que é propriedade de uma DNA polimerase especializada conhecida como telomerase. No entanto, a maioria das células somáticas de mamíferos não expressam a telomerase, e isso leva à perda progressiva e cumulativa das sequências protetoras de telômeros nas extremidades dos cromossomos. Devido à sua reparação restrita, danos aos telômeros são notavelmente persistentes e altamente eficientes em induzir senescência e/ou apoptose (Fumagalli et al., 2012; Hewitt et al., 2012). O encurtamento dos telômeros explica a capacidade proliferativa limitada de alguns tipos de células em cultura in vitro, a chamada senescência replicativa, ou limite de Hayflick (Hayflick e Moorhead, 1961; Olovnikov, 1996).

#### *1.1.1.3 Alterações epigenéticas*

Epigenética é definida como mudanças hereditárias na atividade e expressão de genes que ocorrem sem alterações na sequência de DNA (Goldberg et al., 2007; Bird, 2007). Uma



variedade de alterações epigenéticas afeta todas as células e tecidos ao longo da vida (Talens et al., 2012). Dentre estas alterações estão envolvidas modificações nos resíduos de citosina no DNA (metilação global ou local do DNA) e de proteínas histonas associadas ao DNA (metilação, acetilação e trimetilação) além do remodelamento da cromatina. O aumento da acetilação e trimetilação bem como a diminuição da metilação ou trimetilação de certas histonas constituem marcadores epigenéticos associados à idade (Fraga and Esteller, 2007; Han and Brunet, 2012). Os múltiplos sistemas enzimáticos que asseguram a geração e manutenção dos padrões epigenéticos incluem DNA metiltransferase, histonas desacetilases, acetilases, metilases e desmetilases bem como complexos proteicos implicados no remodelamento da cromatina.

#### *1.1.1.4 Perda de Proteostase*

Proteostase, ou homeostase proteica, refere-se ao processo pelo qual as células controlam a quantidade e o enovelamento de proteínas, sendo composta de uma rede interligada que integra a regulação da expressão génica, vias de sinalização, chaperonas moleculares e sistemas de degradação de proteínas (Hipp et al., 2012). Proteínas desenoveladas geralmente são novamente enoveladas por proteínas de choque térmico (HSP) ou são destruídas por meio de ubiquitinação-degradação proteossômica ou degradação lisossomal (autofagia). As vias autofágicas incluem o reconhecimento de proteínas desdobradas pela chaperona Hsp70 e sua posterior transferência para dentro dos lisossomos (autofagia mediada por chaperonas) ou sequestro de proteínas e organelas danificadas por autofagossomos que posteriormente fundem-se com lisossomos (macroautofagia). A falta do re-enovelamento ou degradação proteica de proteínas mal formadas pode levar ao seu acúmulo e agregação, o que resulta em efeitos proteotóxicos (López-otin et al. 2013). O envelhecimento e algumas doenças relacionadas ao envelhecimento estão ligados a proteostase prejudicada (Powers et al., 2009).

#### *1.1.1.5 Sensibilidade desregulada a nutrientes*

A capacidade de perceber e responder a flutuações nos níveis de nutrientes ambientais é um requisito para vida. A escassez de nutrientes é uma condição seletiva que deu forma à

evolução de muitos processos celulares. Diferentes vias que detectam níveis intracelulares e extracelulares de açúcares, amino ácidos e lipídios são integradas e coordenadas a nível organismal através de sinais hormonais (Efeyan et al., 2015). Um exemplo é o eixo somatotrófico em mamíferos. Este eixo compreende o hormônio do crescimento (GH), produzido pela hipófise anterior, e seu mediador secundário, o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), produzido em resposta ao hormônio do crescimento (GH) por muitos tipos de células, principalmente hepatócitos. As vias de sinalização intracelulares do IGF-1 são as mesmas induzidas pela insulina, as quais informam a presença de glicose para as células. Por esta razão, a sinalização da insulina e IGF-1 são conhecidas como via de "sinalização insulina e IGF-1" (IIS). Notavelmente, a via de IIS é a via controladora do envelhecimento mais evolutivamente conservada, e entre os seus múltiplos alvos estão a família de fatores de transcrição forkhead box O (FOXO) e os complexos do mTOR, que são igualmente envolvidos no envelhecimento e foram conservados através da evolução (Barzilai et al, 2012.; Fontana et al., 2010; Kenyon, 2010).

Consistente com a relevância da sensibilidade desregulada a nutrientes como um marcador do envelhecimento, a restrição dietética (DR) aumenta a vida útil e a saúde em todas as espécies eucariotas investigadas, incluindo primatas não-humanos (Colman et al., 2009; Fontana et al., 2010;

Mattison et al., 2012). De fato, as evidências atuais disponíveis apoiam firmemente a ideia de que a sinalização anabólica acelera o envelhecimento e a diminuição da sinalização de nutrientes estende a longevidade (Fontana et al., 2010).

#### *1.1.1.6 Disfunção mitocondrial*

Como em células e organismos envelhecidos, a eficácia da cadeia respiratória tende a diminuir, aumentando assim a dispersão de elétrons e redução da geração de ATP (Green et al., 2011). Esta disfunção mitocondrial resulta no aumento da produção de ERO que por sua vez faz com que ocorra uma continua degradação mitocondrial e dano celular global (Harman, 1965).

Mitocôndrias disfuncionais podem contribuir para o envelhecimento independentemente de ROS (Edgar et al, 2009; Hiona et al, 2010) e isto pode acontecer através de numerosos de mecanismos. Por exemplo, as deficiências mitocondriais podem afetar a sinalização apoptótica, aumentando a propensão das mitocôndrias em tornarem-se

mais permeáveis em resposta ao stress (Kroemer et al., 2007) e desencadear reações inflamatórias mediadas por ERO /ou ativação facilitada por permeabilização de inflamassomas (Green et al., 2011).

A eficiência reduzida da bioenergética mitocondrial com o envelhecimento pode resultar de vários mecanismos convergentes, incluindo redução da biogênese mitocondrial. Outros mecanismos que causam a defeitos bioenergéticos incluem o acúmulo de mutações e deleções no mtDNA, oxidação de proteínas mitocondriais, desestabilização da organização macromolecular de complexos da cadeia respiratória, alterações na composição lipídica das membranas mitocondriais, alterações na dinâmica da mitocondriais que resultam de um desequilíbrio de eventos de fissão e fusão e defeitos no controle de qualidade pela mitofagia, uma forma específica de organela macroautofágica que tem como alvo mitocôndrias deficientes para degradação proteolítica (Wang e Klionsky, 2011). A combinação do aumento de danos e redução do volume de renovação (turnover) na mitocôndria, devido à menor biogênese e redução da depuração (clearance), pode contribuir para o processo de envelhecimento.

#### *1.1.1.7 Senescência celular*

A senescência celular pode ser definida como um impedimento do ciclo celular acoplado a alterações fenotípicas estereotipadas (Kuilman et al., 2010; Collado et al., 2007). Este fenômeno foi descrito originalmente por Hayflick em cultura de fibroblastos humanos (Hayflick e Moorhead, 1961). Hoje, sabe-se que a senescência observada por Hayflick é causada pelo encurtamento dos telômeros (Bodnar et al., 1998), mas há outros estímulos associados ao envelhecimento que desencadeiam a senescência independentemente desse processo telomérico. Mais notavelmente, danos ao DNA não telomérico e supressão do locus INK4/IRA (região codificante de três genes supressores de tumor; INK4A, INK4B e ARF) ocorrem progressivamente com o envelhecimento cronológico e também são capazes de induzir a senescência (Collado et al., 2007).

#### *1.1.1.8 Exaustão de células tronco*

O declínio no potencial regenerativo dos tecidos é uma das características mais

evidentes do envelhecimento. Um desgaste funcional semelhante tem sido encontrado em praticamente todas as células tronco adultas. Isto se correlaciona com o acúmulo de danos ao DNA (Rossi et al., 2007) e com a supraexpressão de proteínas inibidoras do ciclo celular (Janzen et al., 2006). Encurtamento dos telômeros é também uma importante causa de declínio de células tronco com o envelhecimento em vários tecidos (Flores et al, 2005; Sharpless e De Pinho, 2007). Estes são apenas exemplos de um quadro muito maior no qual o declínio de células tronco surge como uma consequência integradora de vários tipos de danos.

#### *1.1.1.9 Comunicação intercelular alterada*

Além das alterações celulares autônomas, o envelhecimento também envolve alterações em nível de comunicação intercelular, seja endócrina, neuroendócrina ou neuronal (Laplante and Sabatini, 2012; Rando and Chang, 2012; Russell and Kahn, 2007; Zhang et al., 2013). Assim, uma alteração das comunicações intercelulares resulta em disfunção da sinalização neuro-hormonal, “inflammaging” (inflamação sistêmica de baixo grau estabelecida durante o envelhecimento fisiológico), imunossenescência e efeitos “bystander” (efeito em que as células senescentes induzem senescência em células vizinhas através do contato célula-célula) e processos envolvendo ERO (Nelson et al, 2012).

O grande desafio é compreender minuciosamente a interrelação entre os fatores aqui abordados e suas contribuições relativas ao envelhecimento, tendo como objetivo final identificar alternativas farmacológicas e não farmacológicas com o intuito de melhorar a saúde humana e retardar o envelhecimento, com efeitos colaterais mínimos.

## 1.2 IMUNOSSENSCÊNCIA, *INFLAMMAGING* E O PAPEL DO HIPOTÁLAMO NO ENVELHECIMENTO

O envelhecimento saudável e longevidade parecem estar relacionados, em parte, a menores níveis de inflamação ou mecanismos de proteção mais eficientes que promovem proteção contra os efeitos nocivos da inflamação. Entre as diversas alterações observadas com o envelhecimento o desequilíbrio do sistema imune tem grande destaque. Este desequilíbrio resulta de defeitos em ambas as respostas imunes (imunossenescência) e controle da inflamação crônica (*inflammaging*) e estes dois fenômenos são associados a comunicação

intercelular alterada.

A imunossenescência caracteriza-se por um declínio nas funções do sistema imune com um devido a um desequilíbrio entre o sistema imune inato e adaptativo. As mudanças mais relevantes são observadas no sistema imune adaptativo, tais como, diminuição de células T naíve e um concomitante aumento da memória celular (Arnold et al., 2011; Frasca et al., 2011). Com relação a alterações no sistema imune inato, são observados declínio mielóide (Dykstra et al., 2011), defeito em células natural killers (Le Garff-Tavernier et al., 2010) e desregulação de neutrófilos (Hearps et al., 2012). A imunossenescência é acompanhada por um fenótipo pró-inflamatório crônico que é relacionado ao envelhecimento em mamíferos, definido como *inflammaging* (Salminen et al., 2012). Uma característica do *inflammaging* são os níveis alterados de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )), proteínas de fase aguda (proteína C-reativa) e os níveis de IL-10 diminuídos, prejudicando desta forma a manutenção da homeostasia imunológica (Franceschi et al., 2000). Estes fenômenos são amplamente ligados a diversas doenças relacionadas à idade em diversos órgãos incluindo o cérebro.

Vários mecanismos contribuem para a imunossenescência e o *inflammaging*. Por exemplo, as **células senescentes** secretam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento e proteases denominados coletivamente como fenótipo secretor associado à senescência (SASP) por intermédio da superativação de diversas vias moleculares reguladoras do processo inflamatório (Freund et al, 2010; Chinta et al, 2014; Ovadya e Krizhanovsky, 2014). **Infecções crônicas** contribuem para o desequilíbrio entre os sistemas imune adaptativo e inato, promovendo imunossenescência e *inflammaging* (Kochetal., 2007). A **predisposição genética** também tem um papel chave, pois pode levar a um aumento de respostas inflamatórias não controladas, que pode acelerar a imunossenescência e o *inflammaging* (Derhovanessian et al., 2010). **Alterações hormonais**, como a diminuição da produção de estrogênos ou androgênos também influenciam na secreção de citocinas (Maggioetal, 2006; Abu-Tahaetal, 2009). Finalmente, **disfunções mitocondriais e metabólicas** em diversos tecidos, com maior ênfase para o tecido adiposo, podem contribuir para a imunossenescência e o *inflammaging* (Deleidi et al., 2015). Uma vez que o envelhecimento é acompanhado pela senescência progressiva de células imunes (imunossenescência) e pelo *inflammaging* com um conseqüente aumento na produção de mediadores inflamatórios, estas moléculas podem causar o envelhecimento acelerado e comprometer múltiplos sistemas de órgãos.

Os mecanismos celulares e moleculares que controlam imunossenescência no cérebro e

a neuroinflamação ainda não são totalmente compreendidos. Diversos estudos sustentam a existência de uma comunicação bidirecional entre o sistema imune periférico e o cérebro, principalmente através de moléculas imunológicas, incluindo citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda (Wrona, 2006). Por outro lado, o envelhecimento cerebral é capaz de modular o sistema imunológico para promover o recrutamento de células imunitárias da periferia, especialmente linfócitos, que contribuem para imunossenescência e neuro-inflammaging (Gemechu e Bentivoglio, 2012). Além disso, células gliais se tornam senescentes ao longo da vida, perdem a sua função neuroprotetora e se tornam ativadas adquirindo um perfil inflamatório anormal. Tal condição pode ser estabelecida por influência de moléculas inflamatórias e ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) de nitrogênio gerados em células imunes da periferia ou infiltradas no sistema nervoso central (SNC) devido a disfunção da barreira hematoencefálica (macrófagos, neutrófilos e linfócitos T) (Ferrarese et al., 1999). A influência de tais moléculas na ativação de células gliais acarreta na liberação exacerbada de mais mediadores inflamatórios e de estresse oxidativo ( $\bullet\text{NO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{ONOO}\bullet$ —/ $\text{ONOOH}$ ). O aumento do estatus oxidativo bem como os níveis de mediadores inflamatórios no SNC pode ativar diferentes vias de sinalização envolvidas com o processo neuroinflamatório. Por exemplo, a sinalização redox celular, que geralmente envolve quinases, começa com proteínas tirosina quinase/tirosina fosfatase (PTK/PTP) localizadas próximas da membrana plasmática. Foi observado em rim de ratos de 24 meses de idade que o estresse oxidativo pode causar ativação excessiva da PTK e inativação da PTP (Jung et al., 2009). Este desequilíbrio pode desencadear a fosforilação e ativação da sinalização do fator nuclear  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ) além de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs; ERK, p38 e JNK). Além disso, vários receptores de citocinas também estão ligados à sinalização do NF- $\kappa\text{B}$  e MAPKs (p38 e JNK) para melhorar as respostas inflamatórias. Ambos NF- $\kappa\text{B}$  e MAPKs são evolucionariamente conservados, tendo um importante papel na ativação e coordenação da resposta imune adaptativa e inata. Dentre a ampla variedade de genes regulados pelo NF- $\kappa\text{B}$  e MAPKs, incluem-se citocinas, quemiocinas, moléculas de adesão, proteínas de fase aguda e proteínas efetoras induzíveis (iNOS, COX-2, LOX). Como descrito em inúmeros trabalhos, um desequilíbrio destas vias sinalizadoras por influência do envelhecimento contribui para um estado inflamatório que pode desencadear o desenvolvimento de diversas doenças metabólicas e neurodegenerativas (Tilstra et al., 2011).

O aumento da inflamação hipotalâmica com a idade causa vários efeitos nas funções regulatórias e neurogênese no hipotálamo (Tang and Cai, 2013). Esta pequena região neuroendócrina localizada na base do cérebro é composta por uma coleção de células

neurosecretores distintas que recebem múltiplos sinais de praticamente todos os órgãos na forma do eixo órgão-hipotálamo. Ele interpreta, integra e responde a essas mensagens mantendo a homeostase de processos vitais do organismo. Os processos vitais sob o controle do hipotálamo incluem a regulação da temperatura corporal, ingestão de nutrientes e equilíbrio energético, sono e ciclo de vigília, comportamento sexual, ciclicidade reprodutiva, equilíbrio hídrico e de eletrólitos, adaptação ao estresse, nutrição, crescimento e ciclos circadiano e ultradiano (Melmed et al.,2013; Lim et al, 2014; Larsen et al.,2003). Quando a capacidade de resposta desses neurônios diminui durante o envelhecimento, todas as atividades do corpo são afetadas negativamente. Por exemplo, a interrupção da função do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG) desencadeia desregulações homeostáticas de funções do hipotálamo, ou seja, perda de tônus muscular e densidade óssea (o eixo HP-hormônio do crescimento/fator de crescimento semelhante à insulina), declínio da resposta imune adaptativa (o eixo HP-adrenal) e das faculdades cognitivas e interrupções na responsividade a nutrientes. O aumento da obesidade com o passar da idade também está relacionado com a desregulação hipotalâmica, uma vez que há um desequilíbrio entre hormônios orexígenos e anorexígenos (Roa et al., 2012; Wellhauser et al., 2014; Zink et al., 2014).

A estreita integração existente entre os sistemas neuroimune e neuroendócrino parece reger tanto o envelhecimento sistêmico quanto central (Zhang et al., 2013). Desta forma uma ativação descontrolada de células gliais por influência de mediadores inflamatórios oriundos da periferia pode levar a liberação de fatores neurotóxicos com conseqüente disfunção e morte de neurônios hipotalâmicos. Esta condição leva a um desequilíbrio na produção, armazenamento e liberação de hormônios essenciais para o funcionamento do organismo. O reflexo deste desequilíbrio contribui para o “inflammaging” e senescência celular acelerando o envelhecimento sistêmico, além de contribuir para o estabelecimento de um ciclo vicioso (Figura 2).

### 1.3. EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE O ENVELHECIMENTO

O exercício físico regular possui efeitos antienvelhecimento sobre múltiplos sistemas, promovendo desta forma o aumento da expectativa de vida. Embora mais pesquisas sejam necessárias, o exercício tem a capacidade de modular, em parte, muitos marcadores de envelhecimento; tais como diminuição de danos ao DNA nuclear e mitocondrial, aumento da atividade da telomerase, aumento da metilação do DNA em regiões codificantes de gens

específicos (ex. BDNF e PGC-1 $\alpha$ ), indução de autofagia e do sistema ubiquitina-protossoma em diversos tecidos, ativação de vias sensíveis a nutrientes (ex. AMPK, sirtuínas, IGF-1), melhora das funções mitocondriais e biogênese mitocondrial, efeito homeostático sobre a senescência celular, estimulação da proliferação e migração de diferentes tipos de células tronco e efeitos anti-*inflammaging* (Figura 3) (Garatchea et al., 2014).

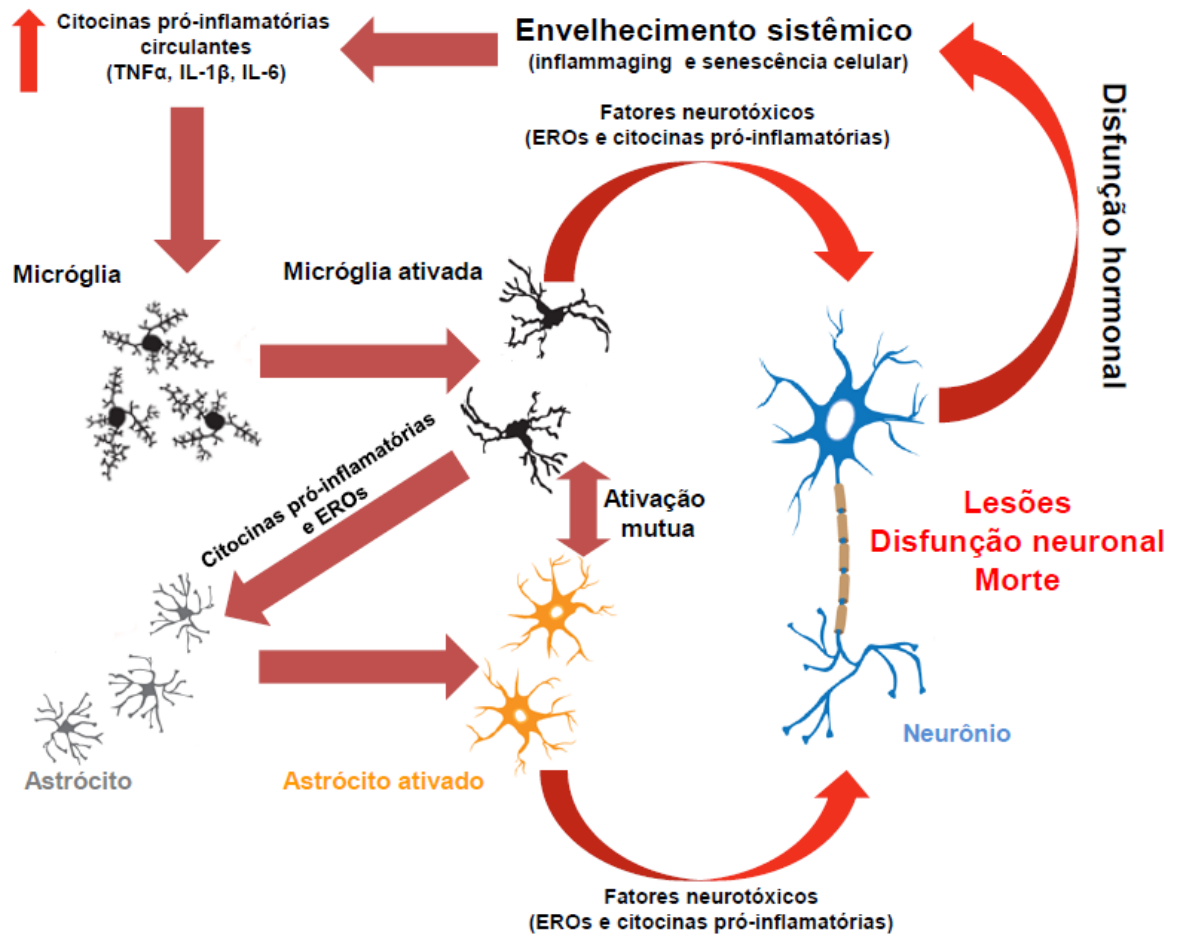


Figura 2. Representação esquemática da inter-relação entre inflamação hipotalâmica e envelhecimento sistêmico (Leite, 2016).

Já é bem descrito que o exercício físico oferece proteção contra uma ampla variedade de doenças crônicas ligadas a inflamação de baixo grau (Penderson and Saltin, 2006). Evidências indicam que a perda induzida pelo exercício de tecido adiposo está relacionada à redução de marcadores séricos de inflamação. É bem conhecido que o tecido adiposo, especialmente a gordura visceral, de seres humanos e animais obesos produz citocinas pró-inflamatórias que contribuem de um modo geral para a inflamação sistêmica (Fried et al., 1998, Harkins et al., 2004). O tecido adiposo de indivíduos obesos contém níveis mais elevados de macrófagos pró-inflamatórios intercalados entre os adipócitos (Xu et al., 2003).



Estas células podem formar células gigantes multinucleadas e podem formar estruturas "crow-like" em torno adipócitos mortos ou moribundos (Cinti et al., 2005). Pouco é conhecido acerca de adipócitos envelhecidos, mas há evidências de que o tecido adiposo visceral de camundongos velhos expressam níveis mais elevados do RNAm da IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 quando comparado com os mesmos depósitos de gordura em camundongos jovens (Wu et al., 2007).

Efeitos do exercício físico		Efeitos do envelhecimento
↓ Dano ao DNA e DNAm, defesas antioxidantes sistêmicas e dano ao DNA, instabilidade genômica, patologia de multisistemas e morte prematura.		Instabilidade genômica
↑ Atividade da telomerase, atividade da TERT e expressão, complexo Shelterin.		Encurtamento dos telômeros
↑ Metilação do DNA (ex. BDNF, PGC-1 $\alpha$ , PDK4, PPAR- $\delta$ ), regulação de DNAmicr. (ex. miR-33, 499-5p), ↑ Histonas PTMs (ex. HATs, HADCs, jmjc).		Alterações epigenéticas
↑ Indução de autofagia no cérebro, coração, músculo esquelético, fígado células pancreáticas $\beta$ e tecido adiposo através de vários mecanismos: IGF-1, Akt/mTOR, Akt/FOXO3a, beclina1 e modula sistemas ubiquitina-protease.		Perda de proteostase
Ativa vias sensíveis a nutrientes no músculo: ↑ mTOR, ↑ AMPK, ↑ SIRT, ↑ GLUT 4, ↑ Testosterona, ↑ GH e ↑ IGF-1.		Sensibilidade a nutrientes desregulada
Melhora a função e a biogênese mitocondrial por regular: ↑ PGC-1 $\alpha$ , ↑ SIRT, ↑ defesas antioxidantes, ↑ proteínas da respiratória.		Disfunção mitocondrial
Regula a senescência celular através: ↑ atividade de células NK, ↓ inflamação, ↓ células senescentes, ↓ p16 <sup>INK4a</sup> , ↓ apoptose, ↑ atividade dos telômeros.		Senescência celular
Estimula a proliferação e migração de diferentes tipos de células tronco		Exaustão de células tronco
Efeitos anti-inflamming: ↑ IL-4, ↑ IL-6, ↑ IL-10, ↑ IL-13, ↓ NLRP3, ↑ AUF1.		Comunicação intercelular alterada

Figura 3. Alguns efeitos do exercício físico sobre os nove marcadores envolvidos com o processo de envelhecimento. Fonte adaptada de Garachea et al., 2014 e Lopez-Otin et al., 2013.

Estudos demonstraram que camundongos obesos alimentados com uma dieta rica em gordura e que realizavam exercício, apresentaram a expressão de genes inflamatórios reduzida no tecido adiposo visceral (Vieira et al., 2009; Horrilo et al., 2011). Dessa forma, supõe-se que o treinamento físico pode ter um efeito semelhante sobre o tecido adiposo envelhecido, embora estudos sejam necessários para confirmar esta hipótese.

Há também mecanismos independentes de perda de gordura pelo qual o exercício físico pode reduzir a inflamação sistêmica em idosos. O exercício agudo no músculo aumenta a produção de IL-6 (Febrario et al., 2002) que é associada com a inflamação, mas que também podem ter propriedades anti-inflamatórias (Petersen et al 2006). Starkie et al (2003) relataram

que o exercício e a infusão de IL-6 podem inibir a produção induzida por endotoxina de TNF- $\alpha$  em humanos sugerindo que a IL-6 pode atuar de uma forma anti-inflamatório (Starkie et al., 2003). Como o treinamento físico é o acúmulo de muitas sessões de exercício agudo individuais, tais aumentos agudos nos níveis de IL-6 podem contribuir para a redução da inflamação crônica a longo prazo. Além disso, o exercício tem a capacidade de aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias (ex. interleucina 10 (IL-10), IL-12, IL-4 e IL-1ra) com consequente diminuição de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , reduzindo assim a inflamação crônica de baixo grau (Otrowsky et al., 1999; Starkie et al. 2003; Petersen and Pedersen, 2005). Outra possibilidade é que o exercício regular reduz o estresse oxidativo por aumentar a regulação dos sistemas de defesa antioxidantes endógenos (Chung et al., 2009). Uma produção exacerbada de oxidantes como o óxido nítrico, o peroxinitrito e radical hidroxil durante o envelhecimento são um importante fator causal na ativação de células imunes pró-inflamatórias (Brad, 2000). Estes efeitos do exercício corroboram com sua capacidade de atenuar o inflammaging e a senescência celular, uma vez que células senescentes transmitem suas condições a outras células através de múltiplos mecanismos incluindo EROs e interleucinas (efeito bystander) (Werner et al., 2009, Nelson et al., 2012).

Como visto anteriormente, as vias das MAPks e do NF $\kappa$ B são intimamente relacionadas com a produção de mediadores inflamatórios em diversos tipos de células. Blazek et al. (2014) observaram que a inflamação periférica e local em camundongos injetados com LPS era reduzida em camundongos que realizavam exercício de corrida. Esta diminuição da inflamação foi relacionada há uma redução da ativação do NF $\kappa$ B em monócitos/macrófagos pelo exercício. Além disso, Ghosh et al. (2014) propõem que o músculo de indivíduos mais velhos possui a sinalização TLR4-NF $\kappa$ B-MAPK aumentada, e que a redução da ativação desta rede de sinalização inflamatória é o mecanismo pelo qual o treinamento físico melhora a sensibilidade à insulina no músculo destes indivíduos idosos. Os efeitos do exercício na regulação da ativação de vias inflamatórias tanto no sistema periférico quanto central parecem estar envolvidos com suas ações anti-inflamatórias, supressão de fontes de geração de ERO e ERN por estimular a biogênese mitocondrial (Viña et al., 2009) bem como reforçar o sistema de defesas antioxidantes (Fulle et al., 2004) e por regular genes específicos envolvidos com estas vias, tais como receptores Toll-like (McFarlin et al., 2006, Gleeson et al., 2006).

O exercício físico tem grandes efeitos sobre a saúde do cérebro em geral. As provas para os efeitos diretos do exercício sobre o cérebro foram descobertas a partir de estudos com animais. Em uma ampla revisão da literatura, Lista e Sorrentino (2010) sugerem que os

mecanismos neurobiológicos básicos associados com o exercício podem ocorrer em dois níveis, supramoleculares e moleculares. Em níveis supramoleculares, a atividade física pode induzir angiogênese ou o processo fisiológico pelo qual novos vasos sanguíneos formam-se a partir de vasos pré-existentes (Black et al., 1990; Isaacs et al., 1992). A atividade física também tem sido associada com a neurogênese, ou proliferação de células neurais, no hipocampo em ratos velhos (van Praag et al., 2005). Embora o significado funcional deste efeito permaneça pouco claro, não há evidências de que os neurónios recém-formados podem integrar-se de uma rede neural e tornarem-se funcionais (Lledo et al., 2006). Sinaptogênese induzida pelo exercício também têm sido relatada (Eadie et al., 2005). Do ponto de vista molecular, os mecanismos pelos quais o exercício induz a angiogênese, neurogênese, e sinaptogênese tem recebido crescente atenção nos últimos anos. Estudos animais demonstraram mudanças associadas ao exercício em fatores de crescimento moleculares, tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que desempenha um papel crucial na neuroplasticidade e neuroproteção, e aumento da produção de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), que está envolvida em ambas neurogênese e angiogênese. Além disso, sistemas de neurotransmissores também parecem ser modulados através do exercício (Lista e Sorrentino, 2010).

Com relação aos efeitos do exercício sobre a inflamação no cérebro, foi observado um efeito anti-inflamatório no hipocampo de ratos velhos que realizavam exercício de corrida (Gomez da Silva et al., 2013). Yi e et al. (2012) demonstraram que camundongos deficientes para o receptor de lipoproteína de baixa densidade (*ldlr* <sup>-/-</sup>) submetidos a uma dieta hiperlipidêmica apresentavam uma diminuição da inflamação hipotalâmica quando realizavam exercício de corrida moderado e regular. Aparentemente, esta diminuição da inflamação hipotalâmica deu-se pelo fato dos animais exercitados apresentarem uma diminuição da ativação da micróglia. Além disso, citocinas anti-inflamatórias tais como a IL-10 ou IL-6 foram encontradas por mediar os benefícios metabólicos do exercício através da redução da inflamação hipotalâmica (Ropelle et al., 2010). Entretanto os exatos mecanismos que podem estar envolvidos nos efeitos benéficos do exercício sobre a inflamação no cérebro, principalmente no hipotálamo, e seu reflexo sobre o envelhecimento ainda não são bem compreendidos.

#### 1.4 EFEITOS DO SELÊNIO SOBRE IMUNIDADE, RESPOSTA ANTIOXIDANTE E ENVELHECIMENTO

O selênio (Se) é um micronutriente no organismo que representa um componente essencial de selenoproteínas que desempenham um papel importante em muitos processos biológicos, incluindo as respostas imunes adaptativas e inatas e defesas antioxidantes (Behne et al., 1998; Kryukov et al., 2003). Em mamíferos, O Se pode ser utilizado tanto na forma inorgânica quanto orgânica como um nutriente. A maioria das funções biológicas de Se são atribuídas a selenoproteínas, que contêm resíduos de selenocisteína (SeCys) responsáveis pela sua atividade específica. Nos seres humanos, 25 genes codificam selenoproteínas, tais como a glutathione peroxidase (GPx), selenoproteína P (SepP) e tioredoxina redutase (TrxR) (Kryukov et al., 2003). Estas selenoproteínas, ao participar na redução de peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos, regulam o estresse oxidativo (Papp et al., 2007). No que diz respeito à eficiência imune, o Se estimula a formação de anticorpos, a atividade de células T helper e células NK (Mehdi et al., 2013). Estudos "in vitro" e "in vivo" em animais mostraram que a glutathione peroxidase e outras selenoproteínas, tais como a tioredoxina redutase (TrxR) e de metionina sulfóxido redutase (MSR), desempenham papéis fundamentais na regulação da concentração de peróxido e outros compostos oxidantes na microbiota de células do sistema imunológico. Durante o envelhecimento, algumas funções fundamentais dos leucócitos, tais como a ativação, proliferação, diferenciação e a fagocitose podem ser comprometidas pelo aumento do dano oxidativo resultante da produção contínua de ERO devido à deficiência de Se (Rayman, 2012).

O papel de Se como um elemento anti-inflamatório está ligado ao seu efeito sobre células do sistema imunológico e, especialmente, nas vias de transdução de sinal de macrófagos. Baixos níveis de Se foram observados na síndrome de resposta inflamatória grave (SIRS), que é marcada pelo aumento de ERO por macrófagos ativados, indução de dano oxidativo e lesão tecidual (Galley et al., 1996). Há também a existência de uma correlação inversa entre os níveis de Se e de IL-6 séricos. Indivíduos idosos com baixos níveis de Se exibem altos níveis de IL-6 em conjunto com um risco mais elevado de mortalidade durante um período de 5 anos, com uma estreita relação entre os níveis de Se e inflamação mediada por IL-6 em idosos (Walston et al., 2006). Zamamiri-Davis et al. (2002) demonstraram que a suplementação com Se resultou em uma diminuição significativa na expressão induzida com LPS de genes para o TNF $\alpha$  e COX-2 através da inibição das vias das MAPKs. De acordo, o

aumento TNF $\alpha$  pode induzir a ativação máxima do NF- $\kappa$ B em baixos níveis de Se (Dantas, 2009). Além disso, níveis elevados de Se pode inibir a sinalização do NF- $\kappa$ B via GPx e atenuar a inflamação. A GPx foi a primeira enzima a ser caracterizada como uma selenoproteína, permitindo identificar o Se como um importante elemento antioxidante agindo através de enzimas que catalisam reações redox (Rotruck et al., 1973). Uma vez que a via do NF $\kappa$ B é dependente do estado redox celular, este parece ser um dos inúmeros mecanismos do Se para diminuir a inflamação.

Do ponto de vista genético, a supressão da selenoproteína S (SepS1) por meio de um RNA interferente em macrófagos provocou o aumento da liberação de IL-6 e TNF- $\alpha$  (Curran et al., 2005). A região promotora do gene para a SepP1 é também sensível a citocinas, sugerindo um papel da SepP1 na inflamação (Dreher et al., 1997).

No geral, os níveis de Se são geralmente considerados como um fator importante para manter a saúde em idosos (Gonzalez et al., 2007; Ray et al., 2006), mesmo que os mecanismos pelos quais a suplementação com Se possa melhorar as respostas imunes e antioxidantes em indivíduos velhos ainda não sejam completamente elucidados.

Apesar do papel essencial do Se para saúde, cabe ressaltar que os limites entre níveis essenciais e tóxicos deste nutriente são bastante próximos. Um fato interessante é que, em geral, compostos orgânicos de Se tem uma maior biodisponibilidade e possuem menos efeitos tóxicos que suas formas inorgânicas (Narajji et al., 2007). Desta forma, diversos estudos têm sido concentrados no desenvolvimento de compostos orgânicos de Se com o intuito de investigar seus efeitos bioquímicos e farmacológicos além de diminuir sua toxicidade.

O disseleneto de difenila [(PhSe) $_2$ ] (Figura 4), um composto organoselênio, apresenta atividade anti-inflamatória em diversos modelos animais. (Nogueira et al., 2003; Savegnago et al., 2007; Hort et al., 2011). Mais especificamente, foi observada uma diminuição dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias pelo (PhSe) $_2$  em um modelo de isquemia/reperfusão em roedores (Brüning et al., 2012) Além disso, Rupill e et al., relataram a capacidade do (PhSe) $_2$  para modular a ativação de macrófagos tratados com LPS, podendo assim reduzir mediadores inflamatórios gerados por estas células.

Além de seus efeitos anti-inflamatórios, o (PhSe) $_2$  também é efetivo em diminuir os níveis de ER devido a sua propriedade antioxidante (Prigol et al., 2009; Luchese et al., 2009), impedindo dessa forma a ocorrência de estresse oxidativo que pode ativar fatores de transcrição sensíveis a redox, tais como o NF $\kappa$ B e MAPKs, e conseqüentemente o processo inflamatório. Já foi relatado que um composto análogo do (PhSe) $_2$ , o bis-(3-hidroxifenil) disseleneto, diminuiu o aumento da expressão de TNF $\alpha$  induzido por LPS devido a inibição

da ativação do NFκB em macrófagos (Shin et al., 2009), o que possibilita levar a hipótese que o (PhSe)<sub>2</sub> pode também reduzir a inflamação por esta via. No entanto um estudo minucioso se faz necessário pra confirmar essa hipótese.



Figura 4. Estrutura química do (PhSe)<sub>2</sub>. Fonte: Palmier C, 1986.

No cérebro, o (PhSe)<sub>2</sub> apresenta efeitos neuroprotetores (Brito et al., 2009; de Freitas et al., 2009; Ghisleni et al., 2003; Ghisleni et al., 2008; Glaser et al., 2014) além de melhorar o desempenho cognitivo em roedores (Cechella et al., 2014; Leite et al., 2014; Rosa et al., 2003; Souza et al., 2010; Stangherlin et al., 2008).

Com base nas considerações acima, os efeitos do exercício físico e do (PhSe)<sub>2</sub> sobre a regulação da inflamação bem como as vias sinalizadoras que controlam este processo, tanto periféricamente quanto no cérebro, apresentam grande potencial para retardar o envelhecimento e/ou combater problemas de saúde relacionados à idade.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Levando em consideração os aspectos abordados anteriormente, o principal objetivo desta tese foi avaliar os efeitos do (PhSe)<sub>2</sub> e exercício de natação sobre alterações ocasionadas pelo envelhecimento tanto no sangue quanto no hipotálamo de ratos velhos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar efeito do (PhSe)<sub>2</sub> juntamente com o exercício de natação sobre os níveis séricos de citocinas pró e anti-inflamatórias em ratos jovens, de meia idade e velhos;
- Determinar a capacidade do (PhSe)<sub>2</sub> juntamente com o exercício de natação em modular a ativação de células gliais em hipotálamo de ratos velhos;
- Investigar os efeitos do (PhSe)<sub>2</sub> juntamente com o exercício de natação sobre proteínas reguladoras do processo apoptótico em hipotálamo de ratos velhos;
- Investigar o envolvimento do (PhSe)<sub>2</sub> juntamente com o exercício de natação sobre mecanismos neuroprotetores.

### **3. ARTIGO**

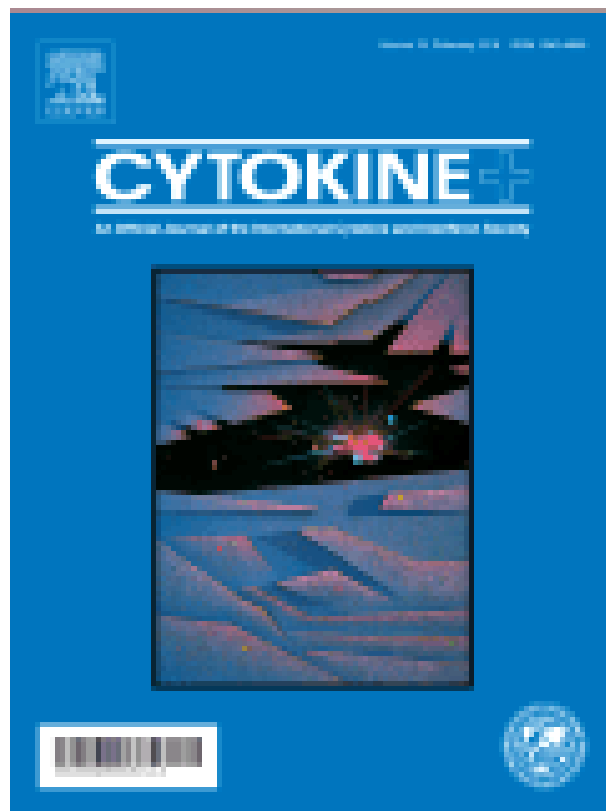
O desenvolvimento desta tese está apresentado sob a forma de um artigo científico e um manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo. Os artigos estão dispostos da mesma forma em que foram publicados ou organizados para a submissão.



## 3.1 ARTIGO 1:

**Swimming exercise and diphenyl diselenide-supplemented diet affect  
the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines differently  
depending on the age of rats**

Marlon R. Leite, José L. Cechella, Anderson C. Mantovani, Marta M.M.F. Duarte,  
Cristina W. Nogueira, Gilson Zeni



Citokine, 2015



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.journals.elsevier.com/cytokine](http://www.journals.elsevier.com/cytokine)

## Swimming exercise and diphenyl diselenide-supplemented diet affect the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines differently depending on the age of rats



Marlon R. Leite<sup>a</sup>, José L. Cechella<sup>a</sup>, Anderson C. Mantovani<sup>a</sup>, Marta M.M.F. Duarte<sup>b</sup>,  
Cristina W. Nogueira<sup>a</sup>, Gilson Zeni<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>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, Rio Grande do Sul, Brazil

<sup>b</sup>Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 August 2014

Received in revised form 16 September 2014

Accepted 18 September 2014

Available online 7 October 2014

#### Keywords:

Age

Exercise

Selenium

Cytokines

Inflammation

### ABSTRACT

The increase in the inflammatory process is one of the main factors that contribute to aging. The aim of this study was to investigate the effects of a diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet (1 p.p.m., 4 weeks) and swimming exercise (3% of body weight, 20 min per day, 4 weeks) on the serum levels of cytokines in Wistar rats of different ages. The results demonstrated an increase in the levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  and INF $\gamma$ ) and a decrease in the levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, with age. In middle-age rats, the swimming exercise and (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet decreased serum levels of pro-inflammatory cytokines and increased the levels of IL-10. By contrast, in old rats the swimming exercise protocol increased the serum levels of pro-inflammatory cytokines and decreased the levels IL-10. Diet supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> did not alter the serum levels of cytokines in old rats. Middle-age and old rats subjected to swimming exercise and supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> in the diet had a decrease in the serum levels of pro-inflammatory cytokines and an increase in the levels of IL-10. This study demonstrated that swimming exercise and (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet affect the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines differently depending on the age of rats. (PhSe)<sub>2</sub> supplemented in the diet had an anti-inflammatory effect, similar to that of induced by swimming exercise, in middle-age rats and reversed the pro-inflammatory effects of swimming exercise in old rats.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The immune system is a complex biological system responsible for the neutralization of harmful environmental agents which can trigger a broad spectrum of pathological mechanisms [1]. However, an immune disorder (immunodeficiency or excessive immune response) can be harmful, causing various diseases.

Evidence from healthy subjects reveals that advanced age is associated with a hyperinflammatory state, characterized by elevated circulating levels of pro-inflammatory mediators [2]. A variety of age-related pathologies; such as atherosclerosis and neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's disease, diabetes, among others; are correlated with an increase in the circulatory levels of pro-inflammatory markers, including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-6 and C-reactive protein [3–5].

Cytokines are cell-signaling proteins responsible for facilitating the return of physiological homeostasis and tissue repair in response to cellular injury induced by trauma or infection, being divided into two distinct types: pro-inflammatory (e.g. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6) and anti-inflammatory cytokines (e.g. IL-4, IL-10 and IL-13) [6]. However, a perturbation in the anti- and pro-inflammatory balance of these molecules represents an important mechanism that contributes to age-related metabolic dysfunctions. Thus, pharmacological and non-pharmacological interventions aiming at regulating the imbalance between anti- and pro-inflammatory cytokines as well as their signaling pathways have been suggested for therapeutic purposes.

It has been shown that physical exercise is effective to reduce (or ameliorate) the risk of age-associated diseases. In fact, there is evidence supporting the involvement of inflammatory mechanisms with the beneficial effects of physical exercise, such as decrease in age-associated immune senescence [7], increase in innate immune function [8] and decrease in chronic inflammation [9]. In addition, previous studies have shown that aerobic exercise

\* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8140; fax: +55 55 3220 8978.  
E-mail address: [gzeni@quimica.ufsm.br](mailto:gzeni@quimica.ufsm.br) (G. Zeni).

reduced circulatory levels of pro-inflammatory markers in both aged humans and rodents [10,11]. Nevertheless, other studies reported that aerobic exercise had no such effects [12,13], making controversial the effect of exercise intervention on circulatory markers of inflammation.

Selenium (Se) is an essential micronutrient that may be used by mammals in both inorganic and organic forms. Most of the biological functions of Se are attributed to selenoproteins. In fact, selenoproteins are involved in the protection against oxidative stress and inflammation [14]. Arnaud [15] designed a study to investigate the relationship between plasma levels of selenium and mortality in an elderly population for a period of 9 years. Increased mortality was observed in individuals with low plasma levels of Se, reinforcing the importance of this trace element for human health. Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub>, an organoselenium compound, exhibits anti-inflammatory activity in several animal models [16–18]. In addition, (PhSe)<sub>2</sub> is effective in reducing the levels of reactive species (RS) due to its antioxidant property [19,20] preventing the occurrence of oxidative stress. Since it is widely reported that such molecules can activate molecular pathways involved in the inflammatory process [21], (PhSe)<sub>2</sub> may be a potential intervention to attenuate inflammation.

The aim of this study was to investigate the effects of swimming exercise and a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet on the serum cytokine profile in Wistar rats at different ages.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Adult (4 months, 12–16% lifespan), middle-age (12 months, 36–48% lifespan) and old (24 months 72–96% lifespan) male Wistar rats were obtained from a local breeding colony and were housed in cages, with free access to food and water. They were kept in a separate air-conditioned (22 ± 2 °C) room, on a 12-h light/12-h dark cycle, with lights on at 7:00 a.m. The animals were used according to the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources (#031/2014), the Federal University of Santa Maria, Brazil.

### 2.2. Drugs

Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> was prepared in our laboratory according to the method described by Paulmier [22] and the chemical purity (99.9%) was determined by GC/MS. Analysis of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure.

### 2.3. Experimental procedure

The animals were divided into four groups (five animals per group) in each age (adult, middle-age and old):

Sedentary: rats received standard diet chow and did not perform exercise.

Sedentary + (PhSe)<sub>2</sub>: rats received 1 ppm of (PhSe)<sub>2</sub> supplemented diet for 30 days and did not perform exercise.

Swimming exercise: rats received standard diet chow and performed swimming training.

Swimming exercise + (PhSe)<sub>2</sub>: rats received 1 ppm of (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and performed the swimming training.

### 2.4. Dietary supplementation

Animals were fed daily with ~150 g/animal standard diet chow or chow supplemented with 1 ppm of (PhSe)<sub>2</sub> (3–4 animals per

cage). The standard diet was pulverized with ethyl alcohol, whereas the supplemented diet was pulverized with (PhSe)<sub>2</sub> dissolved in ethanol (1 mg/10 ml) using a spray bottle. The standard and supplemented diets were kept at room temperature for 3 h to evaporate the alcohol and then kept at 4 °C for a further 1 week [23]. The concentration of (PhSe)<sub>2</sub> found in the diet did not cause overt signals of toxicity [24,25].

### 2.5. Exercise training protocol

Animals were subjected to the pre-training period of 20 min/day, 5 days (swimming exercise and swimming exercise + (PhSe)<sub>2</sub> groups). After the swimming adaptation, rats performed the swimming training with a workload (3% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) [26]. The swimming training was performed between 01:00 and 03:00 p.m. in water at a temperature of 32 ± 1 °C. Rats from sedentary and sedentary + (PhSe)<sub>2</sub> groups were adapted to water, rats were placed in the bottom of a separate tank with shallow water (5 cm) at 32 ± 1 °C, without the workload. At the end of the exercise training, rats were towel-dried and returned to their respective cages.

### 2.6. Determination of cytokines

After training protocol, rats were anesthetized with ketamine (90 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg), for blood collection by heart puncture. Serum (supernatant) was separated by centrifugation at 2400 × g for 10 min and stored at –20 °C until analysis.

Measurement of serum interleukin (IL) IL-1β, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interferon-γ (INF-γ) were assessed using commercial ELISA kits as described by the manufacturer (eBIOSCIENCE, San Diego, USA). Results were expressed in pg/ml for IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α and μg/ml for INF-γ. The sensitivity of the assays for detection of cytokines was as stated in the manufacturer's brochures.

### 2.7. Statistical analysis

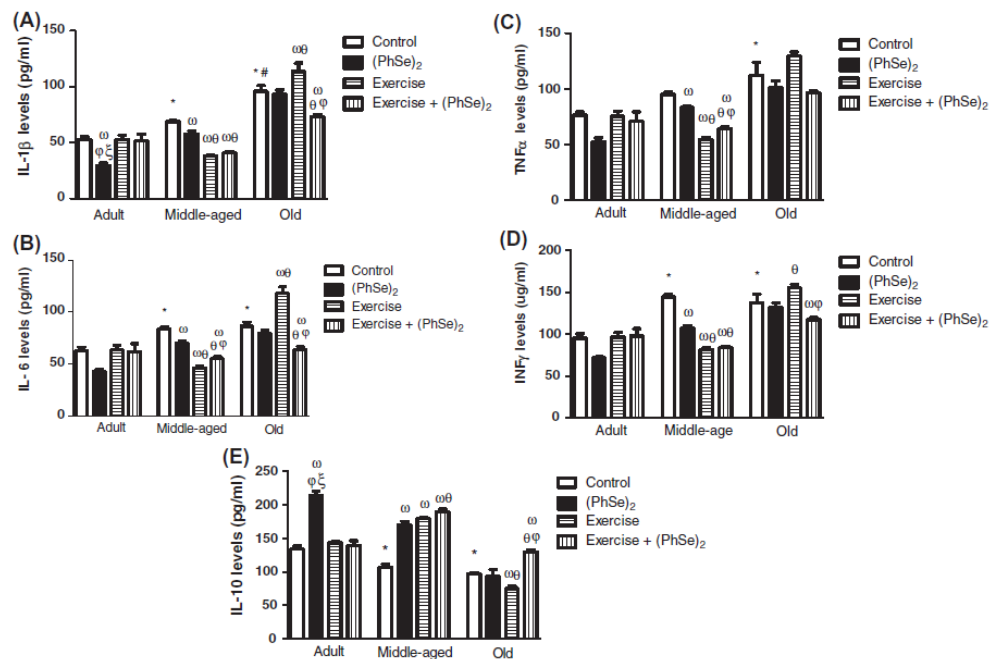
Data are expressed as means ± S.E.M. The statistical significance was assessed by analysis of variance (ANOVA). One-way ANOVA was used to assess the age effect (adult × middle-age × old). Two-way ANOVA was used to assess the effect of training and treatment for each age (swimming exercise × (PhSe)<sub>2</sub>). Post hoc Duncan's test was carried out when appropriated. A value of *p* < 0.05 was considered to be significant.

## 3. Results

### 3.1. Effect of age

Middle-age and old sedentary rats had increased levels of pro-inflammatory cytokines when compared with those of the control adult group. One-way ANOVA demonstrated a significant effect of age in serum levels of IL-1β (*p* < 0.05) (Fig. 1A), IL-6 (*p* < 0.05) (Fig. 1B) and INF-γ (*p* < 0.05) (Fig. 1D). The effect of age in TNFα levels was evident only in old rats (*p* < 0.05) (Fig. 1C). Serum levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were decreased depending on the age (*p* < 0.05) (Fig. 1E).

The ratio between pro- and anti-inflammatory cytokines changed with age. One-way ANOVA revealed a significant age-dependent increase in the ratio of IL1β/IL10 (*p* < 0.05), IL6/IL10 (*p* < 0.05) and TNFα/IL10 (*p* < 0.05) in both middle-age and old rats when compared with that of adult rats (Fig. 2).



**Fig. 1.** Effect of (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise in animals of different ages on the serum levels of IL-1β (1A), IL-6 (1B), TNFα (1C), INFγ (1D) and IL-10 (1E). The rats were supplemented with 1 ppm of (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise was performed (workload 3%, 20 min per day, 5 days a week) for 30 days. One-way ANOVA was used to assess the effect of age. Two-way ANOVA was performed to evaluate the effects of supplementation and exercise for each age. Each column represents the mean ± SEM for 5 rats per group. \**p* < 0.05 compared to the adult control group, #*p* < 0.05 compared to the middle-age control group, ω*p* < 0.05 compared to the control group of each age, φ*p* < 0.05 compared to (PhSe)<sub>2</sub> group of each age, θ*p* < 0.05 compared to exercise group of each age and \**p* < 0.05 compared to (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise group of each age.

### 3.2. Effect of (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet

Post-hoc comparison showed a reduction in the levels of IL-1β (*p* < 0.05) and an increase in IL-10 (*p* < 0.05) in adult rats treated with (PhSe)<sub>2</sub> when compared with those of all other groups (Fig. 1A and E). In middle-age rats, (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet decreased the levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, *p* < 0.05; IL-6, *p* < 0.05; TNFα, *p* < 0.05 and INFγ, *p* < 0.05) but increased the levels of IL-10 (*p* < 0.05) (Fig. 1A–E). Serum levels of cytokines were not affected by (PhSe)<sub>2</sub> in old rats (Fig. 1A–E).

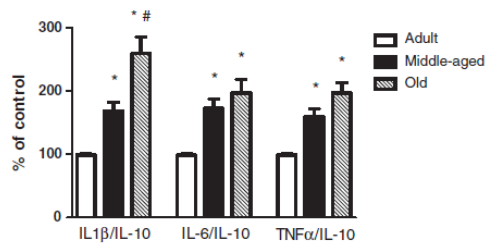
### 3.3. Effect of swimming exercise

Middle-age rats subjected to swimming exercise had a decrease in the levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1β, *p* < 0.05; IL-6, *p* < 0.05; TNFα, *p* < 0.05 and INFγ, *p* < 0.05) and an increase of IL-10 levels (*p* < 0.05) (Fig. 1A–E). By contrast, the levels of pro-inflammatory cytokines were increased (*p* < 0.05) and those of IL-10 were decreased (*p* < 0.05) in old rats subjected to the swimming exercise protocol (Fig. 1A–E). Swimming exercise did not alter the serum levels of cytokines in adult rats (Fig. 1A–E).

### 3.4. Effect of (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise

In adult rats, (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise did not alter the serum levels of cytokines (Fig. 1A–E) compared to those of the respective control group.

By contrast, middle-age rats had a decrease in the serum levels of all pro-inflammatory cytokines when compared with those of the respective control group. Two-way ANOVA demonstrated a significant swimming exercise × (PhSe)<sub>2</sub> interaction for IL-1β (*p* < 0.05) (Fig. 1A), IL-6 (*p* < 0.05) (Fig. 1B), TNFα (*p* < 0.05) (Fig. 1C) and INFγ (*p* < 0.05) (Fig. 1D). In addition, an increase in the serum levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10 was found in middle-age rats of (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and subjected to swimming exercise when compared with those of the respective control rats. Two-way ANOVA demonstrated a significant swimming exercise × (PhSe)<sub>2</sub> interaction for IL-10 (*p* < 0.05) (Fig. 1E).



**Fig. 2.** Effect of age on IL-1β/IL-10, IL-6/IL-10 and TNFα/IL-10 ratio. One-way ANOVA was used to assess the effect of age (adults × middle-age × old). Data are presented as percentage of control (control group = 100%). \**p* < 0.05 compared to the adult control and #*p* < 0.05 compared to the middle-age control.



Except for TNF $\alpha$  levels (Fig. 1C), supplementation with (PhSe) $_2$  and swimming exercise decreased the serum levels of pro-inflammatory cytokines and increased those of IL-10 in old rats when compared with the levels of the respective control group. Two-way ANOVA demonstrated a significant swimming exercise  $\times$  (PhSe) $_2$  interaction for IL-1 $\beta$  ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1A), IL-6 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1B), INF $\gamma$  ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1D) and IL-10 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1E).

#### 4. Discussion

The age-dependent increase in the serum levels of pro-inflammatory cytokines and a decrease in the levels of the anti-inflammatory cytokine demonstrated in this study are in agreement with previous studies [13,27]. The mechanisms involved in the changes of circulating inflammatory mediators caused by aging are not fully understood, but changes related to immune senescence, such as gradual decline in protective immune response, deregulation of immune effector cells, and remodeling of cytokines and chemokine networks are proposed [28,29].

The present study investigated the serum levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  and IL-10 in Wistar rats supplemented with (PhSe) $_2$  in the diet and subjected to swimming exercise at different ages. Swimming exercise modified the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines only in middle-age and old rats. First, the effects of exercise on middle-age rats resulted in the decrease of serum levels of pro-inflammatory cytokines and an increase in the serum levels of IL-10. One possible explanation for the modulation of inflammatory cytokines by swimming exercise in middle-age rats is the reduction of the number of CD14+ and CD16+ as well as the TNF $\alpha$  production by monocytes as observed in humans [30,31]. In addition, the fact that an increase in IL-10 was accompanied by a decrease in the pro-inflammatory cytokine profile may also support the anti-inflammatory effects of swimming exercise.

Another important point to be considered is the redox state. A feature of aging is the occurrence of redox imbalance caused by an increase in the levels of RS together with a system of inefficient antioxidant defenses [32]. This imbalance allows an increase in activation of redox-sensitive transcription factors promoting to molecular activation of pro-inflammatory genes, eventually lead to inflamed tissues and organs [33]. Exercise promotes the adaptive process involving the up-regulation of genes encoding antioxidant enzymes [34], preventing a redox imbalance that could activate pathways linked to inflammation. This is a mechanism to be considered, which may explain, at least in part; the effects of swimming exercise in middle-age rats.

In old rats, swimming exercise increased the serum levels of pro-inflammatory cytokines and decreased those of IL-10. Based on these results, the swimming exercise protocol, which is considered moderate for adult and middle-age rats, seems to have been exhausting for old rats, causing pro-inflammatory effects. The relationship between overtraining and oxidative stress has been documented in previous studies [35–37]. As mentioned above, the redox imbalance caused by an increase in RS levels together with a weakened antioxidant defense system promote the activation of redox-sensitive transcription factors and increase the levels of pro-inflammatory markers, a common phenomenon during aging [33]. Thus, a possible explanation for the increased levels of pro-inflammatory cytokines in old rats would be an excessive production of RS induced by exhaustive exercise in animals which already have a high redox imbalance. However, the involvement of other mechanisms in the pro-inflammatory effects of swimming exercise in old rats cannot be neglected.

In middle-age and old rats, the association of (PhSe) $_2$ -supplemented diet and swimming exercise was effective in lowering circulating levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  and

INF $\gamma$ ) and in increasing the serum levels of IL-10 when compared with animals supplemented with (PhSe) $_2$  in the diet and those of the control group. By contrast, in the present study there was no change in inflammatory markers of adult rats. The anti-inflammatory and antioxidant activities of (PhSe) $_2$  have been widely reported [38,39]. Because the inflammatory process and oxidative stress are closely related, the effectiveness of (PhSe) $_2$  in reducing the levels of inflammatory cytokines that were increased by age and swimming exercise in old rats may be related to its antioxidant activity as demonstrated by Hort [18]. Furthermore, (PhSe) $_2$  could prevent the degradation of inhibitor  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) and consequently inhibit the activation of nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), a transcription factor that modulates inflammatory genes. This proposal is based on the study of Shin [40] that observed the anti-inflammatory effects of bis(3-hydroxyphenyl) diselenide, an analogue compound of (PhSe) $_2$ , via inhibition of degradation of I $\kappa$ B and NF $\kappa$ B inactivation. The effects of (PhSe) $_2$ -supplemented diet and swimming exercise association were similar to those of caused by swimming exercise protocol in middle-age rats. In other words, in middle-age rats, the association of (PhSe) $_2$ -supplemented diet and swimming exercise was not effective in lowering circulating levels of pro-inflammatory cytokines with respect to exercise alone.

Finally, with the exception of old rats, a (PhSe) $_2$ -supplemented diet was effective in lowering circulating levels of pro-inflammatory cytokines in adult and middle-age animals, thereby demonstrating an anti-inflammatory potential. Moreover, the levels of anti-inflammatory cytokine IL-10 were increased by (PhSe) $_2$  in both ages. Based on the arguments aforementioned, the effectiveness of (PhSe) $_2$  in lowering the serum levels of pro-inflammatory cytokines may be due to its antioxidant property and the modulation of molecular pathways related to the inflammatory process. The findings of this study also indicate a beneficial effect of (PhSe) $_2$  on pro- and anti-inflammatory balance, especially in middle-age rats.

Hyperactive immune system can cause autoimmune and inflammatory diseases. However, underactive immune system will increase susceptibility to infections and diseases [41]. Thus, balance of pro- and anti-inflammatory responses and the immune system are beneficial or harmful depending on the background conditions. Although some pathologies are more common in old age, other diseases related to immune imbalance as cancer, autoimmunity (e.g. multiple sclerosis), infections, etc. are less severe or with lesser incidence in old age. The results of this study demonstrated a gradual increase in the imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines with advancing age. These results clearly reflect a state of hyperactivation of the immune system, which can cause various diseases due to this imbalance. Thus, both swimming exercise and (PhSe) $_2$ -supplemented diet could induce the return of this system to the homeostatic state.

In conclusion, this study demonstrated different effects of swimming exercise and (PhSe) $_2$ -supplemented diet on the serum levels of cytokines in rats of different ages. Nevertheless, more studies are needed to investigate the possible mechanisms of action involved in the anti- and pro-inflammatory effects of swimming exercise and anti-inflammatory effects of (PhSe) $_2$ -supplemented diet.

#### Acknowledgment

The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged.

#### References

- [1] Chaplin DD. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117 (2 Suppl Mini-Primer):S430–5.
- [2] Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* 2000;908:244–54.

- [3] Steffens S, Mach F. Inflammation and atherosclerosis. *Herz* 2004;29:741–8.
- [4] Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006;147(Suppl 1):S232–40.
- [5] Sjöholm A, Nystrom T. Inflammation and the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22:4–10.
- [6] Gomes da Silva S, Simoes PS, Mortara RA, et al. Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats. *J Neuroinflammation* 2013;10:61.
- [7] Woods JA, Lowder TW, Keylock KT. Can exercise training improve immune function in the aged? *Ann N Y Acad Sci* 2002;959:117–27.
- [8] Kohut ML, Senchina DS. Reversing age-associated immunosenescence via exercise. *Exerc Immunol Rev* 2004;10:6–41.
- [9] Bruunsgaard H. Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation. *J Leukoc Biol* 2005;78:819–35.
- [10] Jankord R, Jemiolo B. Influence of physical activity on serum IL-6 and IL-10 levels in healthy older men. *Med Sci Sports Exercise* 2004;36:960–4.
- [11] Okita K, Nishijima H, Murakami T, et al. Can exercise training with weight loss lower serum C-reactive protein levels? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1868–73.
- [12] Marcell TJ, McAuley KA, Traustadottir T, et al. Exercise training is not associated with improved levels of C-reactive protein or adiponectin. *Metabolism* 2005;54:533–41.
- [13] Jeon H, Mun GI, Boo YC. Analysis of serum cytokine/chemokine profiles affected by aging and exercise in mice. *Cytokine* 2012;60:487–92.
- [14] Ryan-Harshman M, Aldoori W. The relevance of selenium to immunity, cancer, and infectious/inflammatory diseases. *Can J Diet Pract Res* 2005;66:98–102.
- [15] Arnaud J, Akbaraly TN, Hininger I, et al. Factors associated with longitudinal plasma selenium decline in the elderly: the EVA study. *J Nutr Biochem* 2007;18:482–7.
- [16] Nogueira CW, Quinhones EB, Jung EA, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. *Inflamm Res* 2003;52:56–63.
- [17] Savegnago L, Jesse CR, Pinto LG, et al. Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice. *Brain Res* 2007;1175:54–9.
- [18] Hort MA, Straliootto MR, Netto PM, et al. Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr<sup>-/-</sup> mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011;58:91–101.
- [19] Luchese C, Pinton S, Nogueira CW. Brain and lungs of rats are differently affected by cigarette smoke exposure: antioxidant effect of an organoselenium compound. *Pharmacol Res* 2009;59:194–201.
- [20] Prigol M, Bruning CA, Zeni G, et al. Protective effect of disubstituted diaryl diselenides on cerebral oxidative damage caused by sodium nitroprusside. *Biochem Eng J* 2009;45:94–9.
- [21] Chung HY, Sung B, Jung KJ, et al. The molecular inflammatory process in aging. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:572–81.
- [22] Paulmier C. Selenium reagents and intermediates. Oxford: Organic synthesis Pergamon; 1986.
- [23] de Bem AF, Portella Rde L, Colpo E, et al. Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2009;105:17–23.
- [24] de Bem AF, de Lima Portella R, Perottoni J, Becker E, Bohrer D, Paixao MW, et al. Changes in biochemical parameters in rabbits blood after oral exposure to diphenyl diselenide for long periods. *Chem Biol Interact* 2006;162:1–10.
- [25] de Bem AF, Portella RL, Farina M, Perottoni J, Paixao MW, Nogueira CW, et al. Low toxicity of diphenyl diselenide in rabbits: a long-term study. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2007;101:47–55.
- [26] Ravi Kiran T, Subramanyam MV, Asha Devi S. Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2004;137:187–96.
- [27] Vasto S, Candore G, Balistreri CR, et al. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mech Ageing Dev* 2007;128:83–91.
- [28] Shurin GV, Yurkovetsky ZR, Chatta GS, et al. Dynamic alteration of soluble serum biomarkers in healthy aging. *Cytokine* 2007;39:123–9.
- [29] Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, et al. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *J Proteomics* 2011;74:2313–23.
- [30] Timmerman KL, Flynn MG, Coen PM, et al. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise? *J Leukoc Biol* 2008;84:1271–8.
- [31] Sloan RP, Shapiro PA, Demeersman RE, et al. Aerobic exercise attenuates inducible TNF production in humans. *J Appl Physiol* 1985;2007(103):1007–11.
- [32] Yu BP. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radical Biol Med* 1996;21:651–68.
- [33] Chung HY, Kim HJ, Kim JW, et al. The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci* 2001;928:327–35.
- [34] Brooks SV, Vasilaki A, Larkin LM, et al. Repeated bouts of aerobic exercise lead to reductions in skeletal muscle free radical generation and nuclear factor kappaB activation. *J Physiol* 2008;586:3979–90.
- [35] Dong J, Chen P, Wang R, et al. NADPH oxidase: a target for the modulation of the excessive oxidase damage induced by overtraining in rat neutrophils. *Int J Biol Sci* 2011;7:881–91.
- [36] Tanskanen M, Atalay M, Uusitalo A. Altered oxidative stress in overtrained athletes. *J Sports Sci* 2010;28:309–17.
- [37] Zoppi CC, Macedo DV. Overreaching-induced oxidative stress, enhanced HSP72 expression, antioxidant and oxidative enzymes downregulation. *Scand J Med Sci Sports* 2008;18:67–76.
- [38] Luchese C, Prigol M, Duarte MM, et al. Diphenyl diselenide reduces inflammation in the mouse model of pleurisy induced by carrageenan: reduction of pro-inflammatory markers and reactive species levels. *Inflamm Res* 2012;61:1117–24.
- [39] Bruning CA, Prigol M, Luchese C, et al. Protective effect of diphenyl diselenide on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury: involvement of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. *Neurochem Res* 2012;37:2249–58.
- [40] Shin KM, Shen L, Park SJ, et al. Bis-(3-hydroxyphenyl) diselenide inhibits LPS-stimulated iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophage cells through the NF-kappaB inactivation. *J Pharm Pharmacol* 2009;61:479–86.
- [41] Gomez CR, Boehmer ED, Kovacs EJ. The aging innate immune system. *Curr Opin Immunol* 2005;17:457–62.

3.2 MANUSCRITO 1:

**A Diphenil Diselenide-Supplemented Diet and Swimming Exercise Promote Neuroprotection, Reduced Cell Apoptosis and Glial Cell Activation in the Hypothalamus of Old Rats**

A Diphenil Diselenide-Supplemented Diet and Swimming Exercise Promote Neuroprotection, Reduced Cell Apoptosis and Glial Cell Activation in the Hypothalamus of Old Rats

Marlon R. Leite,<sup>1</sup> José L. Cechella,<sup>1</sup> Simone Pinton,<sup>2</sup> Cristina W. Nogueira,<sup>1</sup>  
Gilson Zeni<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>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, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, CEP 97500-701, Rio Grande do Sul, Brasil

\*Correspondence should be sent to:

Gilson Zeni

Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brasil.

Phone: 55-55-3220- 9611

FAX: 55-55-3220-8978

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

## ABSTRACT

Aging is a process characterized by deterioration of the homeostasis of various physiological systems; although being a process under influence of multiple factors, the mechanisms involved in aging are not well understood. Here we investigated the effect of a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet (1 p.p.m., 4 weeks) and swimming exercise (1 % of body weight, 20 min per day, 4 weeks) on proteins related to glial cells activation, apoptosis and neuroprotection in the hypothalamus of old male Wistar rats (27 month-old). Old rats had activation of astrocytes and microglia which was demonstrated by the increase in the levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and ionized calcium-binding adaptor molecule 1 (Iba-1) in hypothalamus. A decrease of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and procaspase-3 levels as well as an increase of the cleaved PARP/full length PARP ratio (poly (ADP-ribose) polymerase, PARP) and the pJNK/JNK ratio (c-Jun N-terminal kinase, JNK) were observed. The levels of mature brain-derived neurotrophic factor (mBDNF), the pAkt/Akt ratio (also known as protein kinase B) and NeuN (neuronal nuclei), a neuron marker, were decreased in the hypothalamus of old rats. Old rats that received a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and performed swimming exercise had the hypothalamic levels of Iba-1 and GFAP decreased. The combined treatment also increased the levels of Bcl-2 and procaspase-3 and decreased the ratios of cleaved PARP/full length PARP and pJNK/JNK in old rats. The levels of mBDNF and NeuN, but not the pAkt/Akt ratio, were increased by combined treatment. In conclusion, a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise promoted neuroprotection in the hypothalamus of old rats, reducing apoptosis and glial cell activation.

**Key-words:** Aging, hypothalamus, inflammation, exercise, selenium.



## 1. INTRODUCTION

Aging is a gradual process caused by genetic, molecular and cellular changes, leading to the end of life (Harman, 2001). Many hypotheses have been proposed to explain the cause of aging and the biological bases for the functional decline (López-Otín et al., 2014). In a recent study, it was demonstrated that hypothalamus plays a key role in the development and lifespan control in rodents. Apparently, hypothalamus has a programmatic role in aging development and this is ruled by the integration between neuroimmune response and neuroendocrine activity (Zhang et al, 2013). In an aged brain, astrocytes and microglia suffer activation becoming hypertrophic and expressing more GFAP and Iba-1, markers of astrocytes and microglia activation, respectively (Blasko et al, 2004). These two types of glial cells can undergo overactivation by influence of pro-inflammatory factors (TNF $\alpha$ , PGE<sub>2</sub>, and INF $\gamma$ ) and oxidative stress ( $\bullet$ NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O $\bullet$ 2<sup>-</sup>). This overactivation is highly related with the generation of more cytotoxic molecules that can lead to neuroinflammation and neurodegeneration (Herman et al, 2012).

Apoptosis is involved in neuronal cell death occurring during the normal aging process being of vital importance in developing and maintaining the normal tissue homeostasis. However, excessive apoptosis seems to highlight the age-associated decline and deterioration in structures and functions of tissues and organs (Muradian and Schachtschabel, 2001). It has been reported that markers of apoptotic cell death, such as caspases, are increased in the old rat brain (Kim et al., 2010). Besides caspases, the Bcl-2 family proteins; including Bcl-2, Bcl-2xl, Bax and Bid; also play important roles in apoptotic process determining the mitochondrial response to apoptotic stimuli, such as pro inflammatory cytokines and free radicals (Upadhyay et al., 2003). Apoptosis is regulated by many intracellular signaling pathways, including the JNK pathway. This protein possesses three isoforms and plays an essential role in modulating the functions of pro- and anti-apoptotic proteins located in mitochondria (Schoroeter et al., 2003). In addition, JNKs are essential mediators of relevant pro-inflammatory functions in microglia (Waetzig et al., 2005). In contrast to apoptotic proteins, the mature form of brain-derived neurotrophic factor (mBDNF) induces the activation of signaling pathways involved with neuronal survival, neuroplasticity and neurogenesis (Cunha et al. 2010), among them the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt pathway.

Pharmacological and non-pharmacological interventions have been proposed to prevent the aging effects. Various nutritional factors are capable of restoring neuroendocrine-

immune network, the metabolic harmony and the capacity to respond to oxidative stress altered by aging (Meydani, 2001).

Selenium (Se) is a trace element that has been reported to have beneficial effects on immune and antioxidant systems (Mocchegiani et al., 2014). Our previous study demonstrated that a diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet improves memory and reduces circulatory levels of pro-inflammatory markers in old rats (Cechela et al., 2014; Leite et al., 2015), making it a potential intervention to alleviate deleterious processes caused by aging. In addition, evidence has been found to suggest that physical exercise reduces the risk of disorders associated with aging (Kim et al., 2003; Erickson and Kramer, 2009). In fact, physical exercise promotes the activation of numerous cell-signaling proteins which are known to be associated with neuronal survival, proliferation, synaptic plasticity (Chen et al., 2007).

Therefore, the aim of the present study was to investigate the effect of a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise on proteins related to glial cells activation, apoptosis and neuroprotection in the hypothalamus of aged rats.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1 *Animals*

Adult (4 months, 12% –16% lifespan) and old (27 months, 81% – 100% lifespan) male Wistar rats were obtained from a local breeding colony and were housed in cages, with free access to food and water. They were kept in a separate air-conditioned ( $22 \pm 2$  °C) room, on a 12-h light/12-h dark cycle, with lights turned on at 7.00 a.m. The present experimental study was approved by the Institutional Ethics Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources from the Federal University of Santa Maria, Brazil and registered under the number of 5394050115.

### 2.2 *Drugs*

Diphenyl diselenide (PhSe)<sub>2</sub> was prepared in our laboratory according to the method described by Paulmier (1986) and the chemical purity (99.9%) was determined by GC/MS.

Analysis of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure.

### *2.3. Experimental procedure*

The animals were divided in eight groups (five animals per group): Group I (adult control) - adult rats received standard diet chow and did not perform exercise; Group II (old control) - old rats received standard diet chow and did not perform exercise; Group III ((PhSe)<sub>2</sub>) - old rats received 1 ppm of (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet for 30 days and did not perform exercise; Group IV (exercise) - old rats received standard diet chow and performed swimming training; Group V (exercise plus (PhSe)<sub>2</sub>) - old rats received 1 ppm of (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and performed swimming training.

### *2.4 . Dietary supplementation*

Animals were fed daily with ~150 g/animal standard diet chow or chow supplemented with 1 ppm of (PhSe)<sub>2</sub> (2-3 animals per cage). The standard diet was pulverized with ethanol, whereas the supplemented diet was pulverized with (PhSe)<sub>2</sub> dissolved in ethanol (1 mg/10 ml). The standard and supplemented diets were kept at room temperature for 3 h to evaporate the alcohol and then kept at 4<sup>0</sup> C for no more than 1 week (de Bem et al., 2009).

### *2.5 Exercise training protocol*

Animals were submitted to the pre-training period of 20 min/day, 5 days (exercise and exercise + (PhSe)<sub>2</sub> groups). After the swimming adaptation, old rats performed the swimming training with a workload (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) (Ravi Kiran et al., 2004). The swimming training was performed between 09.30 and 11 a.m in water at a temperature of 32±1 °C. Rats from adult and old control groups and (PhSe)<sub>2</sub> group were adapted to the water by placing them to the bottom of a separate tank with shallow water (5 cm) at 32±1 °C, without the workload. At the end of the exercise training, rats were towel-dried and returned to their respective cages.

Twenty-four hours after the last swimming training animals were killed by

decapitation, the brains were collected and samples of hypothalamus were prepared for the western blot assay (n= 5 rats/group). For immunohistochemistry assay, rats (n= 3 rats/group) were deeply anesthetized with chloral hydrate (40%, i.p.) and were perfused through the left cardiac ventricle with 0.9% saline solution, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4. After perfusion, the brains were removed, post-fixed in the same fixative solution by 24 hours.

### *2.6 Immunohistochemistry assay*

Dehydrated brains were embedded in paraffin and hypothalamic sections (8  $\mu\text{m}$ ) were cut in a microtome and mounted on SuperFrost-Plus glass slides (Thermo 213 Scientific, Rockford, IL, USA). Paraffin-embedded brain sections were deparaffined, rehydrated, and boiled 3 times in 10 mM citrate buffer, pH 6. Sections were then incubated for 60 min in blocking buffer, containing 10% (v/v) normal donkey serum (DS) in sodium phosphate buffer with 0.1% (v/v) Triton X-100 (PBS-Tx) at room temperature. Subsequently, the sections were incubated overnight at 4°C with mouse anti-GFAP (Sigma, 1:400) in 1% DS diluted in 0.5% PBS-Tx. After three washes in PBS, tissue sections were incubated with anti-mouse Alexa 488 (Invitrogen, 1:400) in 1% DS diluted in 0.5% PBS-Tx for 2 h at room temperature. Thereafter, the sections were washed three times in PBS and then were incubated with 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  DAPI (Invitrogen) for 10 minutes. The sections were washed three times in PBS and mounted on slides with Fluor Save (Merck) and covered with coverslips. Finally, images of hypothalamic sections were obtained on an Axioskop fluorescence microscope (Carl Zeiss) and examined with ImageJ software.

### *2.7 Western blot assay*

Samples of hypothalamus were homogenized in 400  $\mu\text{l}$  sodium dodecyl sulfate (SDS) 5% with protein inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA). Hypothalamus extracts were diluted to a final protein concentration of 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in sample buffer (essentially constituted by Tris•HCl 0.5 M, pH 6.8 (in a final concentration of 62.5 mM), glycine, SDS, dithiothreitol (DTT), the reducing agent, and bromophenol blue, used as a marker to monitor the process of electrophoresis. The samples (20  $\mu\text{g}$  of protein) and pre

stained molecular weight standards (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) were separated by 12% and 17% SDS-PAGE electrophoresis and transferred to nitrocellulose membrane (0.45  $\mu\text{m}$ , Bio-rad) using Transfer-Blot® Turbo™ Transfer System (1.0 A; 30 min for proteins above 25 kDa or 5 min for proteins below 25 kDa) and/equal protein loading was confirmed by Ponceau S staining. After blocking with 3% bovine serum albumin solution, the blots were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-Iba-1 (ionized calcium binding adapter molecule 1) (1:1000; Wako), mouse anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) (1:1000; Sigma-Aldrich), mouse anti-NeuN (neuronal nuclear protein) (1:1000; Millipore), mouse anti-pJNK and JNK (C-Jun N-terminal kinase) (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (1:2000, Abcam), rabbit anti-pAkt and Akt (serine/threonine protein kinase)(Ser 473, 1:1000, Cell Signaling), rabbit-anti-Bcl2 (1:2000, Cell Signaling), rabbit-anti-caspase3 (1:1000, Cell Signaling) and rabbit-anti-PARP (1:1000, Cell Signaling). Rabbit-anti-GAPDH (1:5000, Cell Signaling) was stained as additional control of the protein loading. After primary antibody incubation, membranes were washed and incubated with anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (1:5000, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) for 1 h at room temperature. For protein detection we used chemiluminescence kit (Amersham, São Paulo/Brazil) and the signals were captured with Amersham Imager 600 (GE healthcare life sciences). Optical density (O.D.) of the Western 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 and the respective GAPDH band.

### *2.8 Statistical Analysis*

Data are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean (S.E.M.) and analyzed by Graphpad Prism (version 5). The statistical significance among experimental groups was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls test when necessary. A value of  $p < 0.05$  was considered to be significant.

## **3. RESULTS**

### *3.1 (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise decrease the levels of markers of glial cells activated in the hypothalamus of old rats*

Western blotting data relative to the levels of Iba-1 (17 kDa) and GFAP (50 kDa) in the hypothalamus of old rats are shown in Figs. 1A and B. The one-way ANOVA demonstrated a significant increase in the levels of GFAP ( $p < 0.05$ ) and Iba-1 ( $p < 0.05$ ) in the hypothalamus of control old rats when compared to those of adult rats. Old rats supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> and submitted to swimming exercise had the hypothalamic levels of both Iba-1 ( $p < 0.05$ ) and GFAP ( $p < 0.05$ ) reduced when compared to those of control old rats. Treatment with a diet supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> reduced the levels of Iba-1 ( $p < 0.05$ ), but not of GFAP in the hypothalamus of old rats when compared to those of control old rats. Similar to rats supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> diet and submitted to swimming exercise, old rats that performed swimming exercise had the levels of Iba-1 ( $p < 0.05$ ) and GFAP ( $p < 0.05$ ) reduced when compared to those of control old rats.

The reduction in the levels of GFAP in the hypothalamus of old rats supplemented with a (PhSe)<sub>2</sub> diet and submitted to swimming exercise were further confirmed by immunohistochemistry analysis (Fig. 2).

### *3.2 (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise decrease the levels of proteins involved in the apoptosis and decrease the pJNK/JNK ratio in the hypothalamus of old rats*

The levels of Bcl-2 (26 kDa), procaspase-3 (35 kDa) and the ratio of cleaved PARP/full length PARP (89 and 116 kDa respectively) were determined to further elucidate the role of apoptosis in the (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise effect on the hypothalamus of old rats (Figs. 3A, B and C). The one-way ANOVA revealed a significant decrease in Bcl-2 ( $p < 0.05$ ) and procaspase-3 levels ( $p < 0.05$ ) in the hypothalamus of control old rats when compared to those of adult rats. (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet plus swimming exercise were effective in increasing procaspase-3 ( $p < 0.05$ ) and Bcl-2 levels ( $p < 0.05$ ) in the hypothalamus when compared to those of control old rats. In addition, old rats that received either a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet ( $p < 0.05$ ) or performed swimming exercise ( $p < 0.05$ ) had similar effects on procaspase-3, Bcl-2 and the ratio of cleaved PARP/full length PARP to the combined treatment.

Western blot analyses showed an increase in the cleaved PARP/full length PARP ratio ( $p < 0.05$ ) in the hypothalamus of control old rats when compared to that of adult rats (Fig. 3C). Old rats from (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet, swimming exercise or a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise group showed a decrease in the cleaved PARP/full length PARP ratio ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3C).

In order to investigate the involvement of JNK (54, 46 kDa), immunoblotting assays were performed (Fig. 3D). The pJNK/JNK ratio was increased in the hypothalamus of old rats when compared to that of adult rats ( $p < 0.05$ ). There was a decrease in the pJNK/JNK ratio in the hypothalamus of old rats that performed swimming exercise ( $p < 0.05$ ), received a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet ( $p < 0.05$ ) or received a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and performed swimming exercise ( $p < 0.05$ ).

### *3.3 (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise increase the levels of proteins involved in neuroprotection in the hypothalamus of old rats*

The mature BDNF (14 kDa) levels, a member of the nerve growth factor family of neurotrophins, and the pAkt/Akt (60 kDa) ratio (Figs. 4A and B) were determined in the hypothalamus of old rats. The one-way ANOVA demonstrated a significant decrease of mature BDNF levels ( $p < 0.05$ ) and the pAkt/Akt ratio ( $p < 0.05$ ) in the hypothalamus of control old rats when compared to those of adult rats. A diet supplemented with (PhSe)<sub>2</sub>, swimming exercise or the combination of both treatments increased the levels of mature BDNF ( $p < 0.05$ ), but only swimming exercise increased significantly the ratio of pAkt/Akt ( $p < 0.05$ ) in the hypothalamus of old rats when compared to those of control old rats. (PhSe)<sub>2</sub> and the combination of both treatments had a strong tendency to increase the pAkt/Akt ratio, but there was no significant difference when compared to that of control old rats.

The NeuN (46, 48 kDa) levels, a biomarker for neurons, decreased in the hypothalamus of control old rats ( $p < 0.05$ ) when compared with those of adult rats (Fig 4C). The NeuN levels were increased in the hypothalamus of old rats that received a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet ( $p < 0.05$ ), performed swimming exercise ( $p < 0.05$ ) or the combination of both treatments ( $p < 0.05$ ).

#### 4. DISCUSSION

Aging is a process characterized by a progressive loss of various physiological functions in all species (López-Otin et al, 2013). In the present study we demonstrated the beneficial effects of a diet supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise on proteins related to glial cells activation, apoptosis and neuroprotection in the hypothalamus of old rats. The role of hypothalamus in aging process has been reported by Zhang and collaborators (Zhang et al, 2013).

The present results demonstrated that a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise protected against the increase in the levels of Iba-1 and GFAP and the decrease in the levels of NeuN in the hypothalamus of old rats. Regarding the effects of isolated treatments on these protein levels, swimming exercise or a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet had similar effects on Iba-1 and NeuN to those of the combined treatment, excepting for the effect of a diet supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> that was not effective in reducing the levels of GFAP increased in the hypothalamus of old rats.

The increase in the levels of Iba-1 and GFAP observed in old rats reinforce the idea that aging favors the neuroinflammatory response in the hypothalamus through the activation of astrocytes and microglia. These glial cells suffer a gradual activation process in response to inflammatory factors and oxidative stress, leading to morphological changes and secretion of more pro-inflammatory elements and reactive oxygen species (Morales et.al, 2014). Secretions of these elements induce mutual activation of microglial cells and astrocytes creating a vicious cycle that may eventually trigger neuronal death, such hypothesis is supported by the results of NeuN levels, which were reduced in the hypothalamus of old rats. Therefore, the results of this study suggest that a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise were effective in inhibiting astrogliosis, microglial activation and neuronal death in the hypothalamus of old rats.

A possible explanation to the effects of a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise on astrogliosis, microglial activation and neuronal death is the therapeutic properties of (PhSe)<sub>2</sub> and physical exercise. The antioxidant effects of (PhSe)<sub>2</sub> have been credited to its enzyme mimetic properties (Wilson et al.,1989; Meotti et al., 2004) as well as by increasing the expression of antioxidant enzymes, activating the nuclear translocation of Nrf-2 factor (Mancini et al., 2014). This way, it has been reported that a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet decreases the serum levels of pro-inflammatory cytokines and increases the levels of IL-10 in rats of different ages (Leite et al., 2015). In addition, it has been demonstrated that the up-



regulation of genes that encode antioxidant enzymes is induced by physical exercise, thus preventing oxidative stress that can trigger activation of pathways linked to inflammation (Yu, 1996).

As mentioned before, astrocytes and microglia activated can become a chronic source of pro-inflammatory factors and oxidative molecules in the brain (Herman et al, 2012). These neurotoxic factors can excessively stimulate the apoptotic pathway and consequently neuronal death (Bhalala et al., 2015). The results of the present study showed that a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise were effective against the decrease in the levels of procaspase-3 and Bcl-2 and the increase in the proteolytic cleavage of PARP in hypothalamus of old rats. The decrease in the Bcl-2/Bax ratio facilitates cytochrome c release and activation of caspase-3 that induces the cleavage of PARP inhibiting their DNA repair capacity with consequent cellular disassembly and death (Pollack et al., 2002). Although this study only investigated the levels of procaspase-3, some studies have shown an increase of active caspase-3 levels concomitant with the reduction of those of procaspase-3 (Pinton et al., 2013; Park et al. 2013). Based on this evidence, the present results suggest an increase in the levels of active caspase-3 in the hypothalamus of old rats and the effectiveness of combined treatment in reducing these levels. This idea is further reinforced by the reduction of proteolytic cleavage of PARP in the hypothalamus of old rats fed with a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and submitted to swimming exercise. Furthermore, it has been reported that although Bcl-2 is crucial for inhibiting the intrinsic apoptotic pathway (Upadhyay et al., 2003) its levels tend to be increased with aging (Kaufmann et al., 2001; Jarskog and Gilmore, 2000). Thus, the increase in the levels of Bcl-2 in the hypothalamus of old rats fed with a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and submitted to swimming exercise is another important factor that reinforces the hypothesis that this combined treatment reduced apoptosis in the hypothalamus of old rats.

JNKs can be activated by cellular redox state and pro-inflammatory molecules, such as TNF $\alpha$ , regulating various cellular processes (Zhang e Dong, 2005). The results of this study showed an increase of the pJNK/JNK ratio in the hypothalamus of old rats and the reduction of this ratio by a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise. Waetzig et al. (2005) demonstrated a relevant role of JNKs in the microglial activation in rats, including morphological changes, metabolic activity/proliferation and cytokine transcription. In addition, JNKs can function as proapoptotic kinases inducing the release of apoptotic factor (Lin, 2003). Thus, the findings of the present study suggest that the decrease in the pJNK/JNK ratio in the hypothalamus of old rats fed with a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and submitted to

swimming exercise could reduce, at least in part, astrocytes and microglia cells activation and the intrinsic apoptotic pathway, promoting cellular survival.

As demonstrated in other brain structures of aged rodents (Kim et al., 2010), in the current study the levels of mBDNF and the pAkt/Akt ratio were reduced in the hypothalamus of old rats and the combined treatment was effective in increasing the levels of mBDNF, but not the pAkt/Akr ratio. The TrkB activation by BDNF activates three major cascades of signaling pathways: phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), PI3K/Akt, and extracellular signal-regulated kinases (ERK), which ultimately lead to the phosphorylation and activation of cAMP response element-binding protein (CREB) that mediates transcription of genes essential for the survival and differentiation of neurons (Cunha et al., 2010). In a previous study, we showed that a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise increased the pCREB/CREB ratio in the hippocampus of middle-aged rats (Leite et al., 2014), which could help to explain the effects of combined treatment in these protein levels. However, more detailed studies aiming three major signaling pathways activated by mBDNF are needed to confirm such hypothesis.

Regarding the effects of isolated treatments on these protein levels, it can be proposed that swimming exercise may activate neuroprotective mechanisms in the hypothalamus of old rats via mBDNF and the PI3K/Akt pathway. This proposal is supported by the fact that swimming exercise was effective in increasing the levels of mBDNF and the pAkt/Akt ratio in the hypothalamus of old rats. Adlard et al. (2005) demonstrated that cell proliferation and neurogenesis enhanced by exercise are directly related with increased expression of BDNF. Notably, mBDNF activates signaling pathways such as MAPK/ERK and PI3K/Akt (Cotman et al., 2007). The PI3K/Akt signaling pathway is potentially implicated in numerous functions, such as neurogenesis and synaptic plasticity (Brael-Jungerman et al., 2009). In addition, it is also commonly associated to inhibition of activation of proapoptotic proteins and transcription factors, thereby promoting cell survival (Brazil et al., 2004).

The organoselenium compound (PhSe)<sub>2</sub> has been reported as a neuroprotective agent in different experimental models (Poser et al., 2008; Dobrachinski et al., 2014). In this study a diet supplemented with (PhSe)<sub>2</sub> increased the levels of mBDNF but not the pAkt/Akt ratio in the hypothalamus of old rats, suggesting that the TrkB activation by BDNF activates another unidentified signaling pathway different from PI3K/Akt.

In summary, the findings of the present study demonstrated that a (PhSe)<sub>2</sub>-supplemented diet and swimming exercise were effective to decrease the levels of proteins related to glial cells activation, apoptosis and neuroprotection in the hypothalamus of old rats.

In addition, the effects of (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise on neuroendocrine system are an important source of investigation because neuroimmune/neuroendocrine integration has crucial role in systemic and central aging.

### **Acknowledgments:**

The financial support by FAPERGS, CAPES and CNPq is gratefully acknowledged.

### **REFERENCES**

- Adlard PA, Perreau, VM, Cotman, CW, 2005. The exercise-induced expression of BDNF within the hippocampus varies across life-span. *Neurobiol Aging* 26, 511-520.
- Bhalala US, Koehler RC, Kannan S, 2015. Neuroinflammation and neuroimmune dysregulation after acute hypoxic-ischemic injury of developing brain. *Front Pediatr* 14;2:144.
- Blasko I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P and Grubeck-Loebenstein B, 2004. How chronic inflammation can affect the brain and support the development of Alzheimer's disease in old age: the role of microglia and astrocytes. *Aging Cell* 3: 169-176.
- Brazil DP, Yang ZZ, Hemmings BA, 2004. Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. *Trends BiochemSci*, 29: 233–242.
- Bruel-Jungerman E, Veyrac A, Dufour F, Horwood J, Laroche S, Davis S, 2009. Inhibition of PI3K-Akt signaling blocks exercise-mediated enhancement of adult neurogenesis and synaptic plasticity in the dentate gyrus. *PLoSOne*. 19;4(11):e7901.
- Cunha C, Brambilla R, Thomas KL, 2010. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front MolNeurosci*. 9;3:1.

- Cechella JL, Leite MR, Rosario AR, Sampaio TB, Zeni G, 2014. Diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise enhance novel object recognition memory in old rats. *Age (Dordr)*. 36(4):9666.
- Chen WQ, Viidik A, Skalicky M, Höger H, Lubec G, 2007. Hippocampal signaling cascades are modulated in voluntary and treadmill exercise rats. *Electrophoresis* 28:4392-4400.
- Chung HY1, Lee EK, Choi YJ, Kim JM, Kim DH, Zou Y, Kim CH, Lee J, Kim HS, Kim ND, Jung JH, Yu BP, 2011. Molecular inflammation as an underlying mechanism of the aging process and age-related diseases. *J Dent Res* 90:830-40.
- Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA, 2007. Exercises builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci* 30:464-472.
- Cunha C, Brambilla R, Thomas KL, 2010. A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci* 3:1.
- de Bem AF, Portella Rde L, Colpo E, et al, 2009. Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 105:17-23.
- Dobrachinski F, da Silva MH, Tassi CL, de Carvalho NR, Dias GR, Golombieski RM, da Silva Loreto EL, da Rocha JB, Fighera MR, Soares FA, 2014. Neuroprotective effect of diphenyl diselenide in a experimental stroke model: maintenance of redox system in mitochondria of brain regions. *Neurotox Res* 26:317-330.
- Erickson KI, Kramer AF, 2009. Aerobic exercise effects on cognitive and neural plasticity in older adults. *Br J Sports Med* 43:22–24.
- Harman, D, 2001. Aging: Overview. *Annals of the New York Academy of Sciences* 928:1-21.

- Herman AH, Khandelwal PJ, Rebeck GW, Moussa CEH, 2012. Wild type TCP-43 induces neuro-inflammation and alters APP metabolism in lentiviral gene transfer models. *Exp Neurol* 235:297-305.
- Jarskog LF, Gilmore JH, 2000. Developmental expression of Bcl-2 protein in human cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 119, 225-230.
- Kaufmann JA, Bickford PC, Tagliamonte G, 2001. Oxidative-stress-dependent upregulation of Bcl-2 expression in the central nervous system of aged Fisher 344 rats. *J Neurochem* 76:1099-1108.
- Kim YP, Kim HB, Jang, MH, Lim BV, Kim YJ, Kim H, Kim SS, Kim EH, Kim CJ, 2003. Magnitude- and time-dependence of the effect of treadmill exercise on cell proliferation in the dentate gyrus of rats. *Int J Sports Med* 24:114-117.
- Kim SE, Ko IG, Kim BK, Shin MS, Cho S, Kim CJ, Kim SH, Baek SS, Lee EK, Jee YS, 2010. Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. *Exp Gerontol.* 45:357-365.
- Leite MR, Marcondes Sari MH, de Freitas ML, Oliveira LP, Dalmolin L, Brandão R, Zeni G, 2014. Caffeine and diphenyl diselenide improve long-term memory impaired in middle-aged rats. *Exp Gerontol* 53:67-73.
- Leite MR, Cechella JL, Mantovani AC, Duarte MM, Nogueira CW, Zeni G, 2015. Swimming exercise and diphenyl diselenide-supplemented diet affect the serum levels of pro- and anti-inflammatory cytokines differently depending on the age of rats. *Cytokine.* 71:119-123.
- Lin A, 2003. Activation of the JNK signaling pathway: breaking the break on apoptosis. *Bioessays* 25:1-8.

- López-Otín C, Blasco M A, Partridge L, Serrano M, Kroemer G, 2013. The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194-1217.
- Mancini G, Raniel Stralio M, da Rocha JB, de Bem AF, 2014. Diphenyl diselenide improves the antioxidant response via activation of the Nrf-2 pathway in macrophage cells. *Free Radic Biol Med* 75 Suppl 1:S40.
- Meotti FC, Stangherlin EC, Zeni G, Nogueira CW, Rocha JBT, 2004. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. *Environ Res* 94:276-282.
- Meydani, M., 2001. Nutrition interventions in aging and age-associated disease. *Annals of the New York Academy of Science* 928:226-235.
- Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Malavolta M, Basso A, Piacenza F, Ostan R, Cevenini E, Gonos ES, Monti D, 2014. Micronutrient-gene interactions related to inflammatory/immune response and antioxidant activity in ageing and inflammation. A systematic review. *Mech Ageing Dev* 136-137:29-49.
- Morales I, Guzmán-Martínez L, Cerda-Troncoso C, Farías GA, Maccioni RB, 2014. Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci*. 22;8:112.
- Muradian K and Schachtschabel DO, 2001. The role of apoptosis in aging and age related disease: Update. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie*, 6:441-446.
- Park GB, Choi Y, Kim YS, Lee HK, Kim D, Hur DY, 2013. ROS and ERK1/2- mediated caspase-9 activation increases XAF1 expression in dexamethasone-induced apoptosis of EBV-transformed B cells. *Int J Oncol* 43:29-38.
- Park SH, Kim JH, Nam SW, Kim BW, Kim GY, Kim WJ, Choi YH, 2014. Selenium improves stem cell potency by stimulating the proliferation and active migration of 3T3-L1 preadipocytes. *Int J Oncol* 44:336-342.

- Palmier C, 1986. Selenium reagents and intermediates. Organic synthesis Pergamon, Oxford.
- Pinton S, Souza AC, Sari MH, Ramalho RM, Rodrigues CM, Nogueira CW, 2013. p,p'-Methoxyl-diphenyldiselenide protects against amyloid- $\beta$  induced cytotoxicity in vitro and improves memory deficits in vivo. *Behav Brain Res.* 247:241-247.
- Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C, 2002. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann. NY Acad. Sci.* 959:93-107.
- Posser T, Franco JL, dos Santos DA, Rigon AP, Farina M, Dafré AL, Teixeira Rocha JB, Leal RB, 2008. Diphenyldiselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. *Brain Res* 1199:138-147.
- Ravi Kiran T, Subramanyam MV, Asha Devi S, 2004. Swim exercise training and adaptations in the antioxidant defense system of myocardium of old rats: relationship to swim intensity and duration. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 137:187-196.
- Schroeter H, Boyd CS, Ahmed R, Spencer JP, Duncan RF, Rice-Evans C, Cadenas E, 2003. c Jun N terminal kinase (JNK)-mediated modulation of brain mitochondria function: new target proteins for JNK signalling in mitochondrion-dependent apoptosis. *Biochem J* 372:359-369.
- Upadhyay D, Panduri V, Ghio A, Kamp DW, 2003. Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:180-187.
- Wilson SR, Zucker PA, Huang RC, Spector A, 1989. Development of synthetic compounds with glutathione peroxidase activity. *J Am Chem Soc* 111:5936-5939.
- Yu BP, 1996. Aging and oxidative stress: modulation by dietary restriction. *Free Radic Biol Med* 21:651-668.

Zhang YL, Dong C, 2005. MAP kinases in immune responses. *Cell Mol Immunol* 2:20-27.

Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, Li B, Liu G, Cai D, 2013.

Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$ B and GnRH.

*Nature* 49:211-216.

## LEGENDS AND FIGURES

**Figure 1.** Effect of a diet supplemented with 1 ppm (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on Iba-1 (A) and GFAP (B) levels in the hypothalamus of old male rats (27 month-old). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of five animals per group. #p < 0.05 as compared with the adult group, \*p < 0.05 as compared with the old control group, \$p < 0.05 as compared with the (PhSe)<sub>2</sub> group.

**Figure 2.** Effect of a diet supplemented with 1 ppm (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on GFAP content in the hypothalamus of old male rats (27 month-old). The GFAP content was evaluated by immunofluorescence microscopy. Scale bar: 25  $\mu$ m.

**Figure 3.** Effect of a diet supplemented with 1 ppm (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on the levels of Bcl2 (A) and procaspase-3 (B), the cleaved PARP/full length PARP ratio (C) and the pJNK/JNK ratio (D) in the hypothalamus of old male rats (27 month-old). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of five animals per group. #p < 0.05 as compared with the adult group, \*p < 0.05 as compared with the old control group.

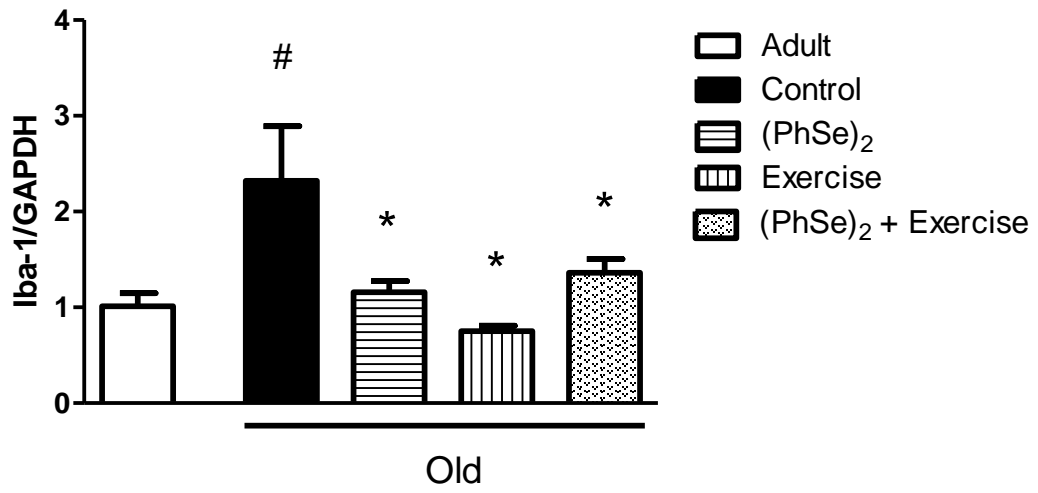
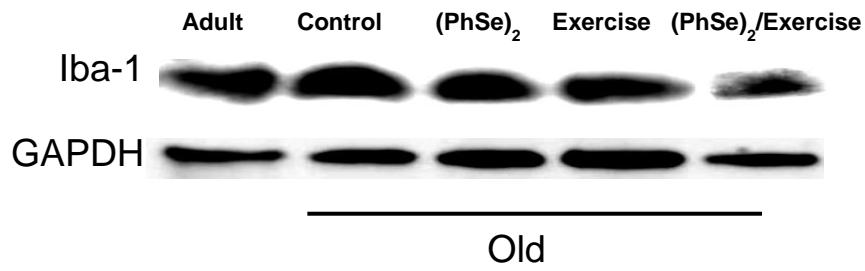
**Figure 4.** Effect of a diet supplemented with 1 ppm (PhSe)<sub>2</sub> and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on mBDNF levels (A) and the pAkt/Akt ratio (B) and NeuN levels (C) in the hypothalamus of old male rats (27 month-old). Values are expressed as the mean  $\pm$  SEM of five animals per group. #p < 0.05 as compared with the adult group, \*p < 0.05 as compared with the old control group. Representative qualitative Western



blotting analysis at the top of each figure, graphic shows representative quantification of the proteins immunocontent normalized to GAPDH protein.

## Figures

1A



1B

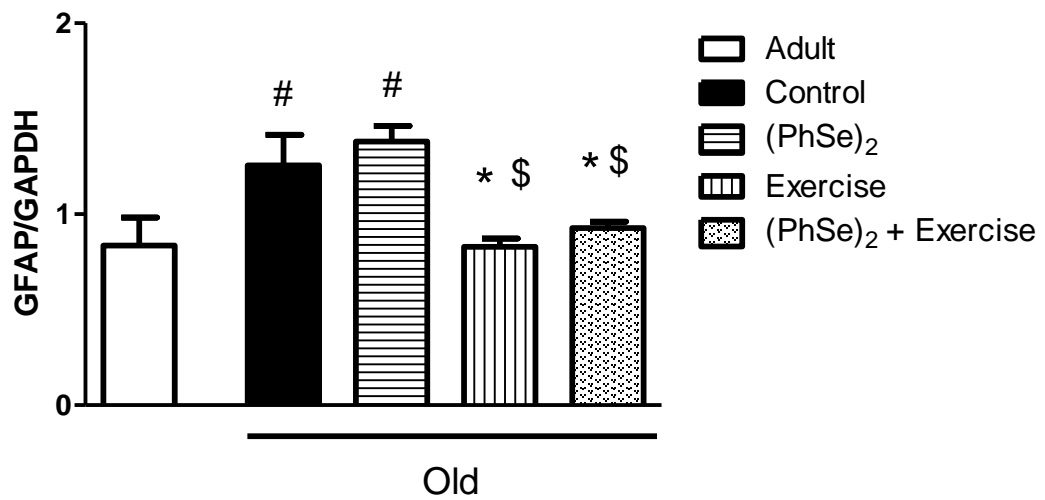
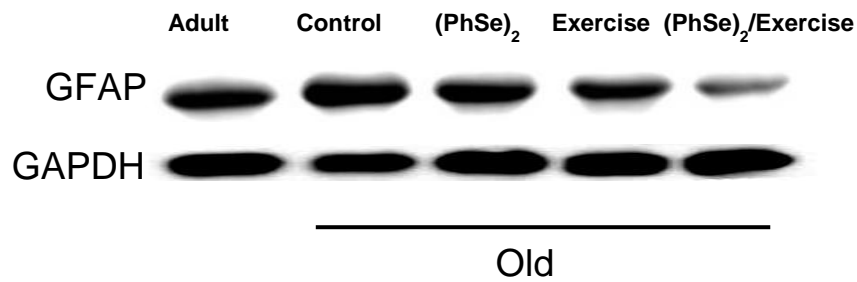


Figure 2

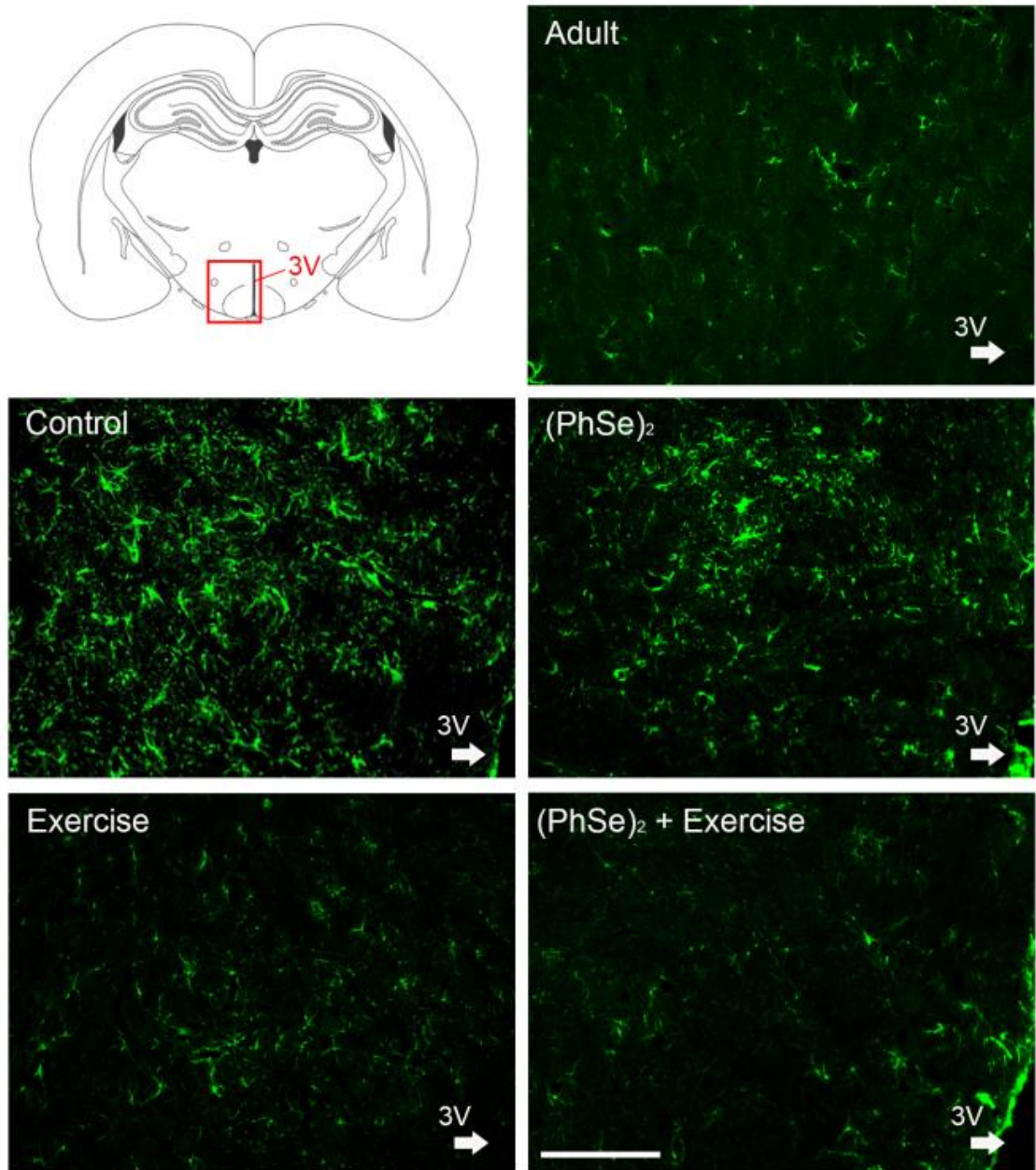
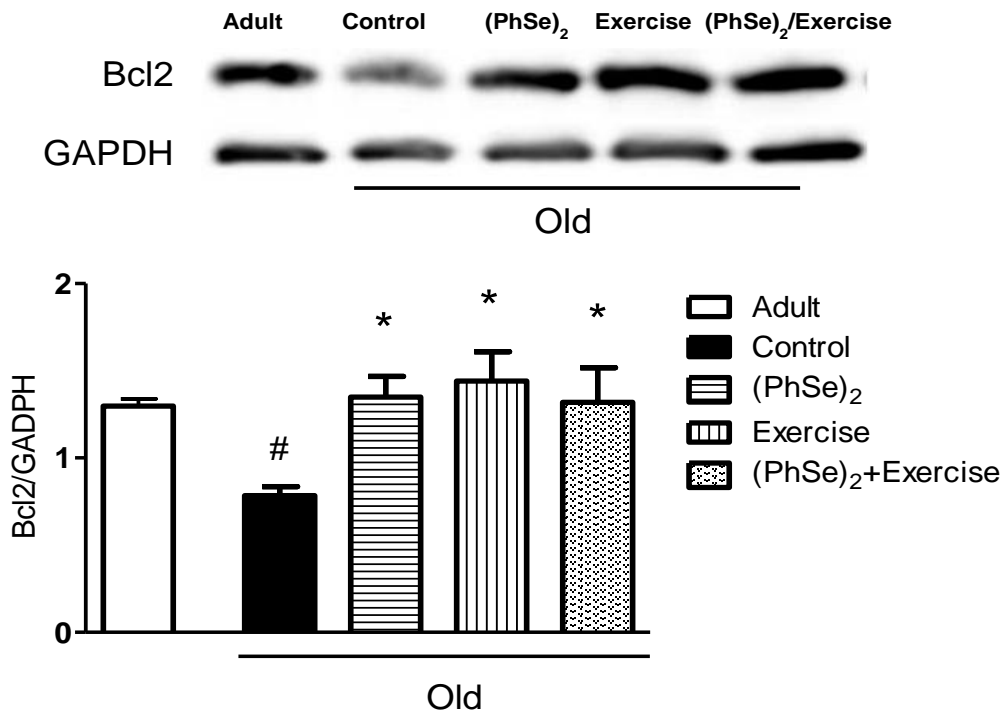
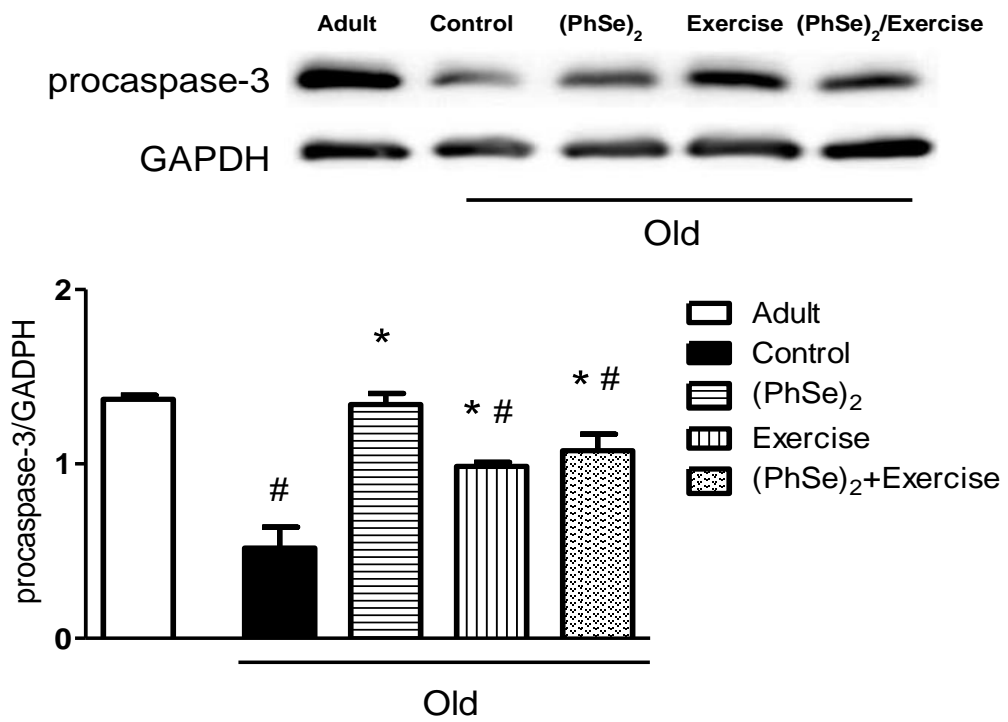


Figure 3

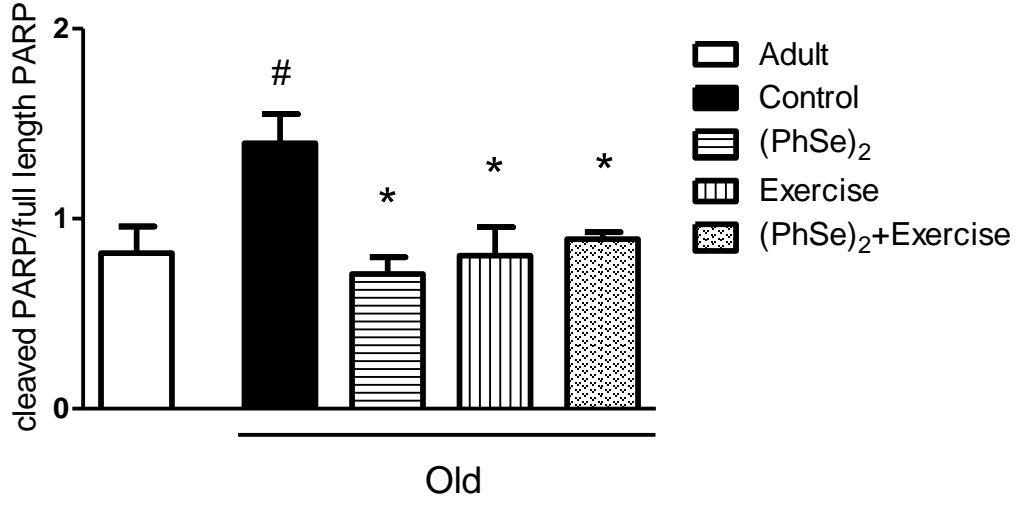
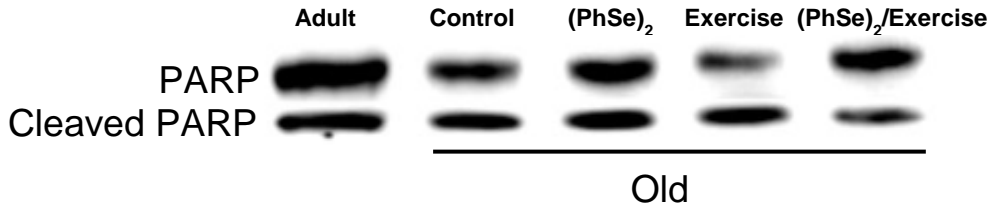
3A



3B



3C



3D

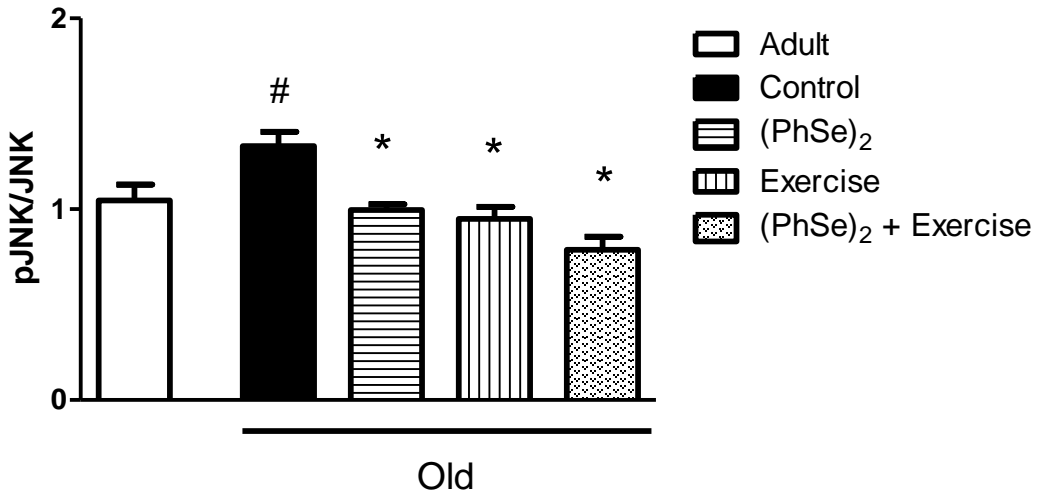
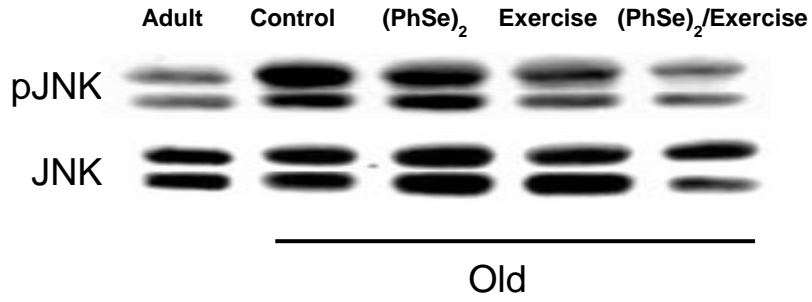
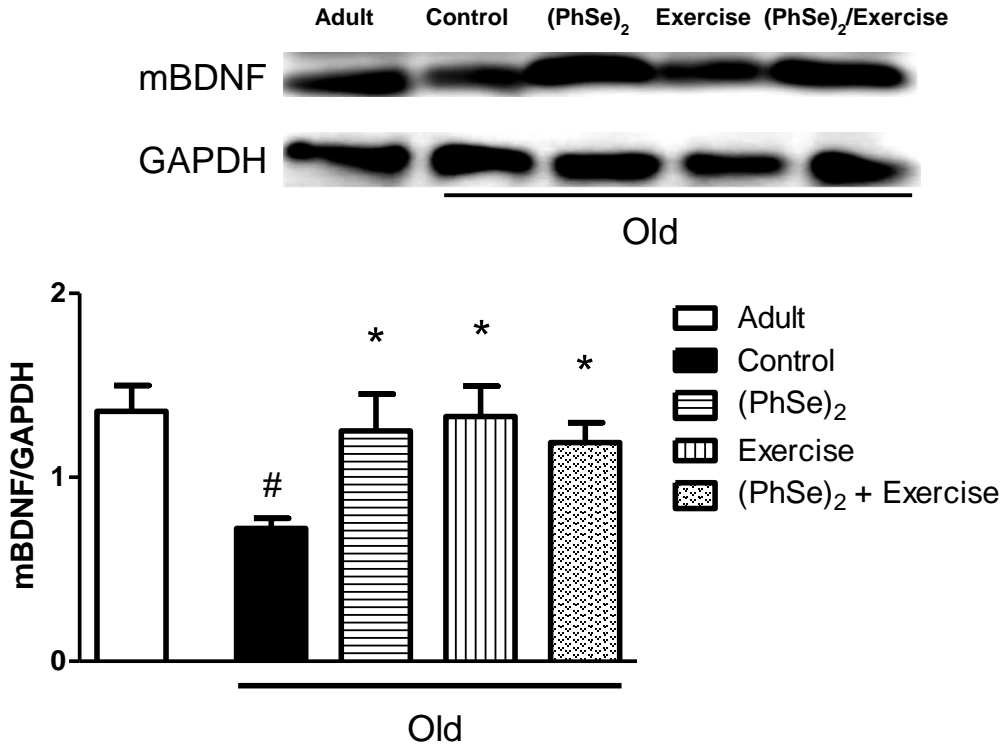
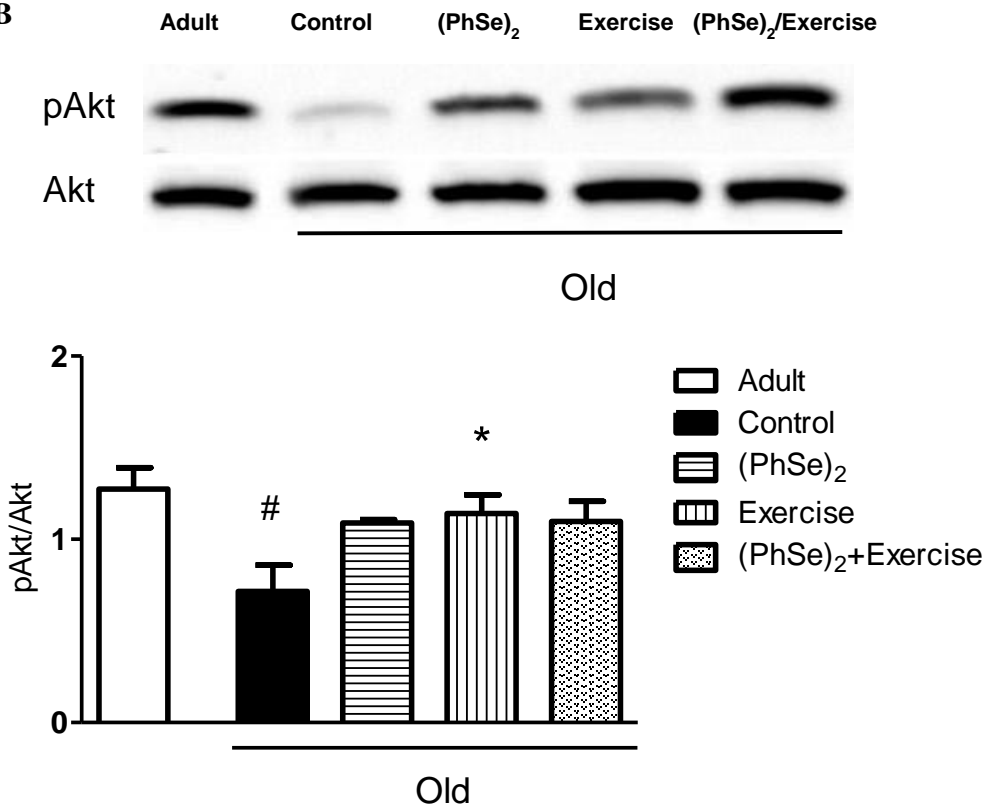


Figure 4

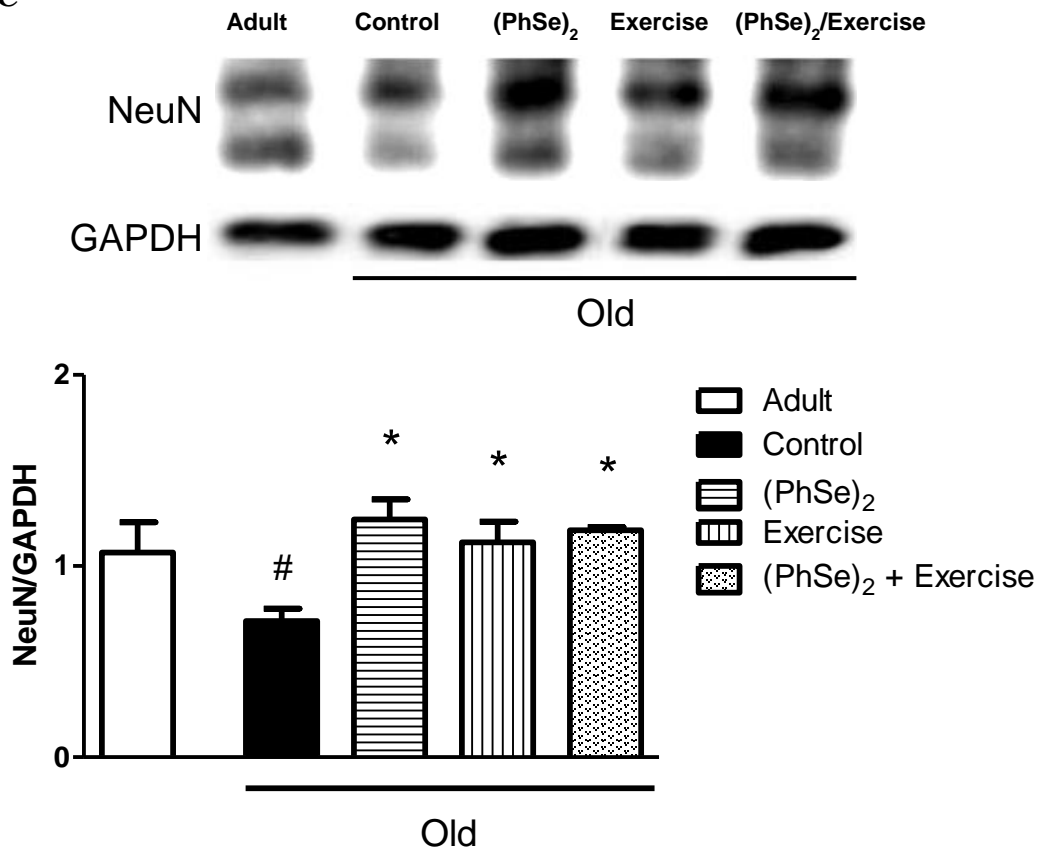
4A



4B



4C



## 4. DISCUSSÃO

A ideia original de que o envelhecimento era regido por uma causa unifatorial foi substituída após intensos anos de pesquisa pela visão de que este processo é influenciado por causas multifatoriais complexas (Weindruch and Walford, 1988; Weinert and Timiras, 2003). A cascata de eventos que leva ao envelhecimento normal pode interagir simultaneamente a nível molecular, celular e sistêmico/central. Quando estes sistemas fisiológicos sofrem alguma perturbação ocasionando uma deficiência em seu funcionamento, o resultado é um desequilíbrio da organização funcional que inibe a capacidade do organismo para responder a diferentes tipos de estresse. O envelhecimento torna-se então a manifestação de uma desordem homeostática generalizada, levando a inúmeras patologias e, finalmente, a morte (Weindruch e Walford, 1988).

Terapias tanto de cunho farmacológico quanto não farmacológico com o intuito de retardar o processo de envelhecimento bem como doenças ligadas a este processo tem sido extensivamente estudadas. Desta forma, o desenvolvimento de drogas que possam minimizar os efeitos da idade tem se intensificado. Inúmeros trabalhos tem descrito as diversas atividades farmacológicas do  $(\text{PhSe})_2$ , despertando o interesse por este composto (Brito et al., 2009; de Freitas et al., 2009; Ghisleni et al., 2003; Ghisleni et al., 2008; Glaser et al., 2014; Moretto et al., 2005a; Moretto et al., 2005b; Posser et al., 2008; Nogueira et al., 2003; Luchese et al., 2009; Meotti et al., 2004; Borges et al., 2005; Wilhelm et al., 2009; Savegnago et al., 2006; de Vargas Barbosa et al., 2008; Melo et al., 2013; Savegnago et al., 2008; Cechella et al., 2014; Leite et al., 2014; Rosa et al., 2003; Souza et al., 2010; Stangherlin et al., 2008). Além disso, os relatos sobre os efeitos benéficos do exercício físico sobre diversos insultos, além do envelhecimento e doenças ligadas a este processo, são muito amplos (Booth et al., 2012). Assim, os resultados apresentados nesta tese demonstram o potencial do  $(\text{PhSe})_2$  e exercício de natação em reduzir mediadores inflamatórios que influenciam diretamente no fenótipo do envelhecimento. De fato, estes tratamentos podem regular vias de sinalização que são descritas por estarem intimamente relacionadas com o processo de envelhecimento em diversos tecidos.

É amplamente aceito que uma característica típica do processo de envelhecimento é um aumento geral dos níveis plasmáticos e a capacidade de células para produzir citocinas pró-inflamatórias (Di Orio et al., 2003; Wei et al., 1993; Bruunsgaard, et al., 1999). Entre



estes mediadores inflamatórios, um papel principal é desempenhado por algumas citocinas agindo principalmente no âmbito da imunidade inata, quer com ações pró ou anti-inflamatórias. As citocinas mais envolvidas no processo inflamatório parecem ser o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  e IL-10 (Salvioli et al., 2006). A perda de controle fisiológico das reações inflamatórias é devido a um desequilíbrio entre os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias, ou a capacidade de restaurar o equilíbrio quando o estímulo inflamatório é diminuído. Isso leva a um estado crônico pró-inflamatório de baixo grau, o *inflammaging*, que contribui para acelerar o envelhecimento além de promover ou exacerbar inúmeras condições patológicas.

O aumento sérico de citocinas pró-inflamatórias com a idade bem como a diminuição nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 demonstrados no Artigo 1 estão de acordo com as considerações abordadas anteriormente. Existem vários mecanismos possíveis da inflamação crônica: (i) a produção persistente de moléculas reativas por infiltração de leucócitos gerados para destruir agentes patogênicos, eventualmente danifica os elementos estruturais celulares e de tecidos; (ii) células não imunes danificadas e células imunes ativadas além de células senescentes levam a produção de citocinas e ERO que amplificam, modulam a resposta inflamatória e alteram o fenótipo de células vizinhas, muitas vezes em detrimento da função tecidual normal (Rodier and Campise, 2011; Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007). Muitos tecidos envelhecidos provavelmente permanecem em um estado cronicamente inflamado embora sem sinais de infecção, o que pode ocasionar (iii) a interferência com a "sinalização anabólica". Por exemplo, IL-6 e TNF- $\alpha$  diminuem a regulação da sinalização da insulina, IGF-1 e eritropoietina e da síntese proteica após uma refeição ou sessão de exercício (Fransechi and Campisi, 2014). Assim a inflamação crônica (*inflammaging*) provavelmente deriva, mas não unicamente, das fontes aqui descritas. Estas fontes não são mutuamente exclusivas, e suas contribuições relativas requerem mais estudos.

Os resultados apresentados no Artigo 1 demonstram o potencial anti-inflamatório do exercício de natação e do (PhSe)<sub>2</sub>. No entanto estes efeitos são dependentes da idade dos animais, pois em animais velhos o exercício de natação mostrou ter um perfil pró-inflamatório e o (PhSe)<sub>2</sub> apresentou um efeito anti-inflamatório somente nos animais velhos que realizavam o exercício de natação, não mostrando um efeito *per se*. O exercício é considerado uma forma facilmente acessível e segura para atenuar a inflamação e senescência celular (Werner et al., 2009). No entanto, os efeitos da intervenção do exercício sobre marcadores de inflamação séricos são controversos. Por

exemplo, alguns estudos demonstram que o exercício aeróbico é capaz de reduzir os níveis circulantes de proteína C reativa (Goldhamme et al., 2005; Okita et al., 2004), enquanto outros estudos relatam que a intervenção do exercício não apresenta efeitos (Hammett et al., 2004; Kelley and Kelley, 2006; Marcell et al., 2005). Um aumento acentuado dos níveis de IL-6 séricos após o exercício sem danos musculares tem sido um achado notavelmente consistente (Drenth et al., 1995; Ostrowski et al., 2000). A IL-6 plasmática aumenta de um modo exponencial com o exercício e está relacionada com a intensidade do exercício, duração, a massa muscular recrutada e a capacidade de resistência muscular (Pedersen BK and Hoffman-Goetz L., 2000; Febbraio and Pedersen, 2002). Dados sugerem que a IL-6 exerce efeitos inibitórios sobre a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Schindler et al., 1990; Mizuhara et al., 1994; Matthys et al., 1995), sugerindo que a IL-6 tem um papel anti-inflamatório. Além disso, concentrações fisiológicas de IL-6 estimulam o aparecimento na circulação das citocinas anti-inflamatórias de IL-1ra e IL-10 além de evidências sugerirem uma indução da lipólise e oxidação de ácidos graxos com consequente diminuição de gordura (Petersen and Pedersen, 2005). Este efeito a longo prazo do exercício podem ser atribuídos à resposta anti-inflamatória induzida por um efeito agudo do exercício, o que é em parte mediado pela IL-6 do músculo. No entanto, a IL-6 parece ter um papel dual sobre a inflamação, pois ela é considerada um marcador de inflamação crônica relacionada a várias patologias. Assim, uma questão fundamental permanece de quais níveis elevados de IL-6 destinam-se a reduzir uma resposta inflamatória que é inapropriadamente longa ou se uma desregulação primária dos níveis de IL-6 é responsável por um estado pró-inflamatório crônico, tendo um impacto negativo sobre a saúde. Não menos importante, é sugerido que a produção moderada de ERO induzida pelo exercício desempenha um papel na indução de defesas antioxidantes resultando na diminuição da incidência da inflamação crônica bem como doenças relacionadas a esta condição e retardo do processo de envelhecimento (Radak et al., 2005). Contudo, uma produção exacerbada de ERO influenciada pelo exercício exaustivo e crônico pode ter um efeito oposto uma vez que vias de sinalização que tem como alvo genes inflamatórios são reguladas pelo estado redox celular.

Selênio é um potente nutriente antioxidante que realiza seus efeitos biológicos através da sua incorporação a selenoproteínas. A principal forma de Se ingerido por seres humanos é a selenometionina (Se-Met), embora outras formas de Se estejam presentes em alimentos. Dados os papéis cruciais que selenoproteínas desempenham na regulação ERO e estado redox em quase todos os tecidos, não é de se admirar que a dieta com Se

influencie fortemente a inflamação e respostas imunes. De fato, o Se e selenoproteínas não são apenas importantes para iniciar ou aumentar a imunidade, mas eles também estão envolvidas na regulação imune, que é crucial para a prevenção de respostas excessivas que podem levar a auto-imunidade ou inflamação crônica (Huang et al., 2012). Durante o envelhecimento, a imunidade adaptativa diminui drasticamente enquanto que a imunidade inata parece ser ativada o que induz um perfil pró-inflamatório característico (Salminen et al., 2012). Como visto anteriormente, este fenômeno é chamado de imunossenescência e está intimamente relacionado ao *inflammaging*. O regulador mestre da imunidade inata é o sistema NFκB, uma via de sinalização sensível a mudanças no perfil oxidativo celular. Dessa forma, dois pontos importantes podem estar relacionados à capacidade do Se de diminuir a inflamação. O primeiro é o fato do Se aumentar células do sistema imune adaptativo, como visto em um estudo onde a suplementação com Se (400 mg/dia) durante 6 meses em pessoas idosas aumentou mais de 50% a porcentagem de células T CD4+ (Wood et al., 2000). O segundo fator é a capacidade do Se de diminuir os níveis de ERO que como visto anteriormente podem ativar as vias de sinalização do NFκB e das MAPKs. Tendo em vista estes efeitos, moléculas orgânicas de Se podem diminuir a inflamação crônica relacionada à idade por restaurar as funções sistema imune adaptativo em organismos envelhecido bem como o equilíbrio do estado oxidativo em células imunes e não imunes. Alguns estudos têm utilizado o composto orgânico de Se ebselen para mostrar que as funções de macrófagos e células dendríticas são afetadas por esse selenocomposto (Matsue et al., 2003; Shimohashi et al., 2000). No entanto, existem poucos estudos sobre os efeitos dos compostos de Se relacionados a mecanismos que regulam a inflamação ou imunidade, e a maior parte dos dados sobre a atividade biológica do Se estão relacionados à sua incorporação em selenoproteínas.

O sistema nervoso central é considerado uma região imunologicamente privilegiada uma vez que células imunitárias periféricas são geralmente bloqueadas pela barreira hematoencefálica (BBB) (Sarma, 2013). Contudo, moléculas inflamatórias secretadas de células imunes e não imunes periféricas podem cruzar uma BBB comprometida. Tais moléculas podem desencadear a superativação de células gliais gerando mais moléculas inflamatórias bem como ERO. Esta condição pode comprometer ainda mais a permeabilidade da BBB, possibilitando que células imunes periféricas circulantes possam migrar para o cérebro e interagir com neurónios e células gliais que expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (região genômica que codifica moléculas MHC de superfície celular que controlam a maior parte do sistema imune). Esta condição

pode provocar ainda mais a migração de leucócitos e macrófagos através da BBB, perpetuando a resposta imune (Gendelman, 2002; t' Hart and Wilfred, 2013). Assim, uma resposta que tem como objetivo proteger o SNC pode se tornar uma inflamação tóxica e generalizada pela produção exacerbada de moléculas inflamatórias e ERO, podendo levar a lesões e morte dos neurônios. O estabelecimento da neuroinflamação pode influenciar negativamente inúmeras regiões do cérebro como a morte de neurônios dopaminérgicos da substancia nigra, uma condição para a doença de Parkinson (Tansey, 2012) e acúmulo de emaranhados neurofibrilares e placas beta-amiloides em neurônios hipocampais, dois marcadores da doença de Alzheimer (Meraz-Rios, 2013). Finalmente, a neuroinflamação no hipotálamo pode causar disfunção e morte de neurônios hipotalâmicos e conseqüentemente um desequilíbrio na liberação de hormônios para diversas regiões do organismo influenciando no aparecimento de diversas doenças metabólicas (Purkayastha and Cai, 2013) e como mostrado recentemente, no avanço do envelhecimento (Zhang et al. 2013).

Uma vez que o exercício de natação foi aparentemente exaustivo para ratos velhos causando um efeito pró-inflamatório (artigo 1), os ratos velhos que realizaram o exercício de natação no manuscrito 1 tiveram uma redução da sobrecarga utilizada afim de evitar efeito semelhantes. Os resultados apresentados no manuscrito 1 mostram claramente que o exercício de natação e o (PhSe)<sub>2</sub> influenciam na modulação de proteínas constituintes de vias moleculares reguladas pelo envelhecimento no hipotálamo. Um aumento da ativação de células microgлияis bem como astrócitos é observado no cérebro de animais velhos e esta ativação é correlacionada com o aumento de mediadores inflamatórios, tanto periféricamente quanto centralmente (Hoogland et al., 2015). Como demonstrado no manuscrito 1, o exercício de natação mais a dieta com (PhSe)<sub>2</sub> foi capaz de diminuir os níveis de Iba-1 e GFAP, marcadores de ativação microglial e de astrócitos respectivamente em hipotálamo de ratos velhos. A diminuição dos níveis de GFAP foi reforçada pelo ensaio de imunohistoquímica. Analogamente a células periféricas imunes e não imunes, as vias que orquestram este processo de ativação de células micrógлияs e astrócitos com conseqüente geração de moléculas inflamatórias e oxidativas é o sistema NFκB e as vias das MAPKs. A JNK é uma quinase pró-inflamatória pertencente à família das MAPKs e pode induzir a translocação do fator de transcrição proteína ativadora-1 (AP-1) (Cai and Liu, 2012). A AP-1 controla numerosos processos celulares tais como diferenciação, proliferação, apoptose além de transcrever genes inflamatórios. Como mostrado no manuscrito 1, o exercício de natação mais a dieta com (PhSe)<sub>2</sub> foi capaz de

diminuir os níveis da JNK ativada (pJNK) no hipotálamo de ratos velhos. Assim esses resultados possibilitam sugerir que a diminuição da fosforilação da JNK pode estar envolvida da redução da ativação de células glias pelo exercício de natação mais a dieta com (PhSe)<sub>2</sub>. Além disso, a JNK é também considerada uma quinase apoptótica.

Dentre os mecanismos desencadeadores de apoptose, a pJNK pode antagonizar a atividade antiapoptótica do Bcl2 e Bcl-X<sub>L</sub> diretamente ou via ativação das proteínas promotoras de morte associado ao Bcl2 (Bad) e proteína 11 semelhante ao Bcl2 (Bim). Isto possibilita a ativação da proteína X associada ao Bcl2 (Bax) 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 and Reddy, 2008). Também foi observada uma diminuição nos níveis de pró-caspase 3 em hipotálamo de ratos velhos. Geralmente é observado um aumento da caspase-3 ativa concomitante com a diminuição da pró-caspase 3, o que sugere um aumento da caspase-3 na sua forma ativa no hipotálamo de ratos velhos. Esta hipótese é reforçada pelo aumento da clivagem da PARP, uma proteína de reparo ao DNA e alvo da caspase 3 ativa. Além disso, estudos demonstraram que a clivagem de Bcl2 e Bcl-X<sub>L</sub> por caspases podem afetar a sua atividade anti-apoptótica. Por exemplo, caspase 3 cliva o Bcl2 para aparentemente criar uma molecule pró-apoptótica (Cheng et al., 1997; Clem et al., 1998; Jhonson and Boise, 1999). De fato, uma diminuição dos níveis de Bcl2 também foi observada, reforçando ainda mais a ideia que os níveis de caspase 3 ativa podem estar aumentados. Com base nestes mecanismos propostos, há um aparente aumento da sinalização apoptótica mitocondrial pela pJNK em hipotálamo de ratos velhos e isto corrobora com a diminuição dos níveis do marcador de neurônios NeuN, como mostrado no manuscrito 1. Os efeitos anti-apoptóticos do exercício de natação mais a dieta com (PhSe)<sub>2</sub> são claros uma vez que os níveis de NeuN foram aumentados no hipotálamo de ratos velhos. O mecanismo anti-apoptótico envolvido parece ser a diminuição da ativação da JNK com a consequente redução da via apoptótica intrínseca, uma vez que os níveis de Bcl2 e pró-caspase 3 foram aumentados além de ser observada uma redução da PARP clivada.

Durante o envelhecimento o acúmulo de citocinas inflamatórias e outras substâncias podem prejudicar vias de transdução de sinal essenciais para a saúde neuronal. As neurotrofinas clássicas NGF, BDNF, e neurotrofinas NT-3 e a NT-4 são bem conhecidas por regular criticamente diversos aspectos da diferenciação neuronal, sobrevivência celular e crescimento. É sugerido que o acúmulo destas moléculas inflamatórias pode levar a um estado chamado “resistência a neurotrofinas” (Cotman, 2005). Em particular,

foi relatado que a administração de citocinas pró-inflamatórias ou de LPS provoca uma redução significativa da expressão do gene BDNF (Raetz e Whitfield, 2002, Lapchak et al., 1993). O impacto negativo da inflamação sobre o BDNF tem importantes implicações para uma série de condições patológicas. Por exemplo, sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias comprometem a memória dependente do hipocampo (Pugh et al., 1998) e aumentam a apoptose no cérebro (Nolan et al., 2003), características que estão envolvidos em vários estados patológicos associados a envelhecimento e as doenças neurodegenerativas. Os resultados presentes no manuscrito 1 mostram uma redução dos níveis de BDNF maduro (mBDNF) bem como a fosforilação da Akt (pAkt) no hipotálamo de ratos velhos e uma reversão pelo exercício de natação mais a dieta com (PhSe)<sub>2</sub>. O mBDNF desencadeia a ativação três proteínas, quinase regulada por sinal extracelular (ERK), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e fosfoinositideo fosfolipase C-γ (PLCγ), que são os seus reguladores *downstream* (Chen et al., 2013). A ativação da Akt pela PI3K tem efeitos agudos sobre a sobrevivência da célula devido à fosforilação da BAD, a qual na forma fosforilada é sequestrada no citosol pela proteína 14-3-3, impedindo os seus efeitos pró-apoptóticos na mitocôndria (Downward, 2004). Dessa forma, além dos mecanismos anti-apoptóticos do exercício de natação mais a dieta com (PhSe)<sub>2</sub> envolvendo a JNK e caspase-3 propostos anteriormente, também podem ser levados em consideração o aumento do mBDNF e pAkt. Além disso, a pAkt é translocada para o núcleo onde pode fosforilar determinados fatores de transcrição, regulando desse modo a expressão de genes específicos que contribuem para a sobrevivência celular (Hanada et al., 2004). De fato, Akt pode promover a sobrevivência de células através da estimulação da expressão gênica, em parte, via elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB) (Du and Montmini, 1998). O CREB é um fator de transcrição que regula diversas respostas celulares, incluindo a proliferação, sobrevivência e diferenciação. Interessantemente, o pCREB liga-se a região promotora do BDNF e Bcl2 aumentando a regulação da expressão de ambas proteínas (Finkbeiner, 2000). Esta poderia ser uma possível explicação para o aumento dos níveis de BDNF e Bcl2 em hipotálamo de ratos velhos induzidos pelo exercício de natação mais a dieta com (PhSe)<sub>2</sub>. Reforçando esta ideia, estudos tem demonstrado que ambos exercício e (PhSe)<sub>2</sub> são capazes de aumentar o CREB fosforilado (pCREB) (Aguiar, 2011; Leite et al., 2014).

Outro importante ponto a ser considerado é a hipótese proposta de que o pCREB pode inibir diretamente a ativação do NFκB através do bloqueio da ligação da proteína de ligação a CREB (CBP) ao complexo NF-κB, limitando assim as respostas pró-

inflamatórias (Wen et al., 2010). Este poderia ser mais um mecanismo pelo qual o exercício de natação mais a dieta com  $(\text{PhSe})_2$  poderiam suprimir os efeitos neuroinflamatórios causados pelo avanço da idade, contudo um estudo minucioso se faz necessário.

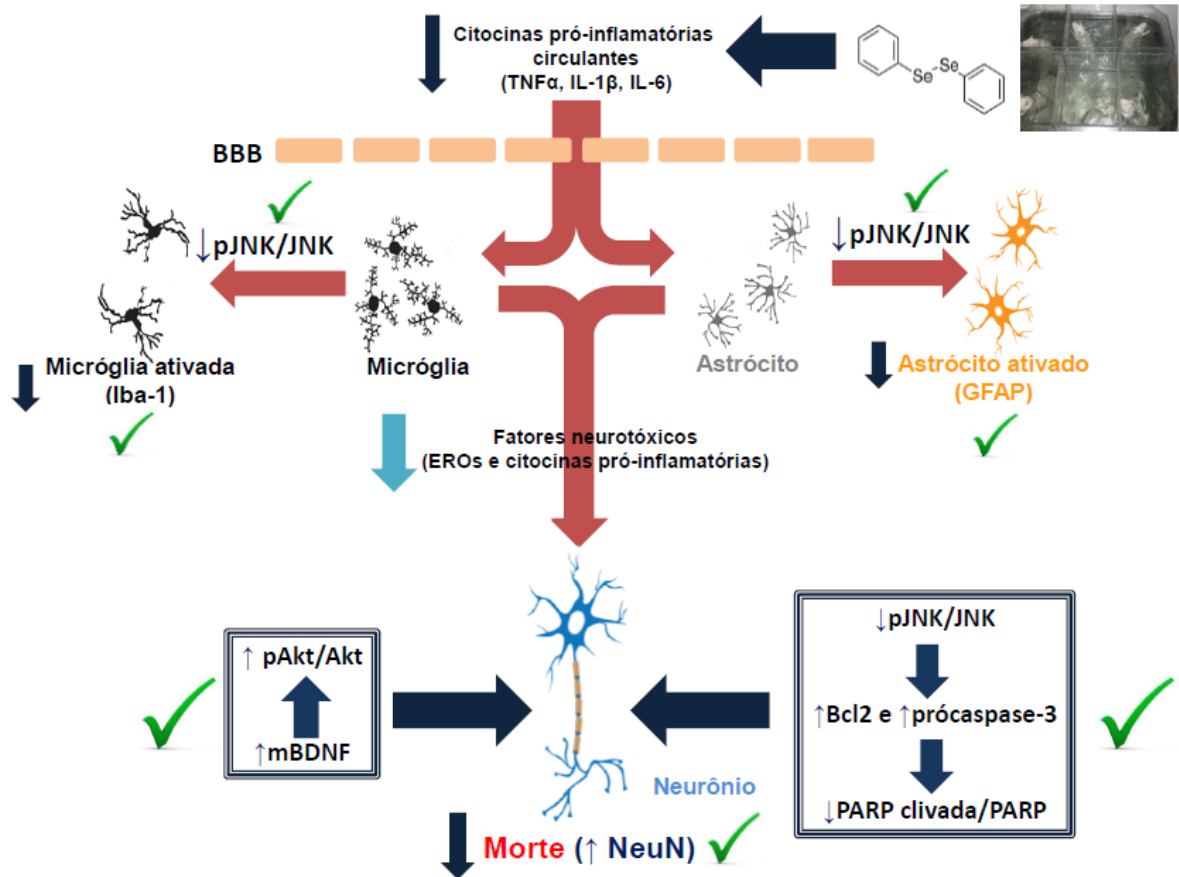


Figura 5. Modelo esquemático dos possíveis mecanismos envolvidos nos efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e exercício de natação no sangue e hipotálamo de ratos velhos (Leite, 2016).

Estes resultados permitiram a proposta de hipóteses mecanísticas para ter-se um melhor entendimento dos efeitos do  $(\text{PhSe})_2$  e exercício de natação sobre modificações causadas pelo envelhecimento, estimulando assim novos estudos para sua confirmação.

## 5. CONCLUSÃO

Os dados apresentados nesta tese possibilitam concluir que:

- Tanto o composto (PhSe)<sub>2</sub> quanto o exercício de natação possuem efeitos anti-inflamatórios em ratos Wistar de meia idade;
- Contudo esses efeitos são dependentes da idade uma vez que em ratos velhos o exercício de natação foi pró-inflamatório e o (PhSe)<sub>2</sub> apresentou efeitos somente em conjunto com o exercício de natação;
- O aumento da ativação de células gliais e da fosforilação da JNK no hipotálamo de ratos velhos foi diminuído pela suplementação com (PhSe)<sub>2</sub> e exercício de natação;
- A suplementação com o (PhSe)<sub>2</sub> e o exercício de natação reduziu a apoptose de células hipotalâmicas em ratos velhos uma vez que os níveis de ambas pró caspase-3 e Bcl2 foram aumentados e a razão da PARP clivada/PARP foi diminuída;
- Os fatores de neuroproteção que auxiliam na sobrevivência celular investigados nesta tese, mBDNF e Akt, foram aumentados em hipotálamo de ratos velhos pela suplementação com (PhSe)<sub>2</sub> e exercício de natação.



**REFERÊNCIAS**

- AGUIAR, A.S.JR.; CASTRO, A.A., MOREIRA, E.L.; GLASER, V.; SANTOS, A.R.; TASCA, C.I.; LATINI, A.; PREDIGER, R.D. Short bouts of mild-intensity physical exercise improve spatial learning and memory in aging rats: involvement of hippocampal plasticity via AKT, CREB and BDNF signaling. **Mech Ageing Dev** 132:560-567, 2011.
- ARNOLD, C.R.; WOLF, J.; BRUNNER, S.; HERNDLER-BRANDSTETTER, D. AND GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. Gain and loss of T cell subsets in old age-age- related reshaping of the T cell repertoire. **J. Clin. Immunol.** 31:137-146, 2011.
- BARTLETT, D.B.; FIRTH, C.M.; PHILLIPS, A.C. ET AL. The age-related increase in low-grade systemic inflammation (inflammaging) is not driven by cytomegalovirus infection. **Ageing Cell.**11:912-915, 2012.
- BARZILAI, N.; HUFFMAN, D.M.; MUZUMDAR, R.H. AND BARTKE, A. The critical role of metabolic pathways in aging. **Diabetes** 61:1315-1322, 2012.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature** 447: 396-98, 2007.
- BLACK, J. E.; ISAACS, K. R.; ANDERSON, B. J.; ALCANTARA, A. A. AND GREENOUGH, W. T. Learning causes synaptogenesis, whereas motor activity causes angiogenesis, in cerebellar cortex of adult rats. **Proc Natl Academy Sci USA**, 87:5568-5572, 1990.
- BLACKBURN, E.H.; GREIDER, C.W. AND SZOSTAK, J. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. **Nat Med** 12: 1133-1138, 2006.
- BLAZEK, A.; KNAPIK, D.; WU, L.; YOUNG, N.A.; JARJOUR, W.N.; AGARWAL, S. Exercise Suppresses Systemic Inflammation Via Inhibition Of NF- $\kappa$ B Activation In Monocytes. **Arthritis Rheum** 2013;65 Suppl 10 :1159
- BOOTH FW, ROBERTS CK, LAYE MJ. Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Compr Physiol** 2:1143-211, 2012.
- BORGES, L.P.; BORGES, V.C.; MORO, A.V.; et al. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology** 210: 1-8, 2005.
- BRITO, V.B.; ROCHA, J.B.; FOLMER, V.; et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice. **Acta Biochim Pol** 56: 125-34, 2009.
- BROD, S.A. Unregulated inflammation shortens human functional longevity. **Inflamm Res** 49:561-570, 2000.
- BRÜNING, C.A.; PRIGOL, M.; LUCHESE, C.; JESSE, C.R.; DUARTE, M.M.; ROMAN, S.S.; NOGUEIRA, C.W. Protective effect of diphenyl diselenide on ischemia and reperfusion-induced cerebral injury: involvement of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines. **Neurochem Res** 37:2249-58, 2012.

- BRUNNSGAARD, H.; ANDERSEN-RANBERG, K.; JEUNE, B.; PEDERSEN, A.N.; SKINHOJ, P.; PEDERSEN, B.K. A high plasma concentration of TNF-alpha is associated with dementia in centenarians. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 54:57-64, 1999.
- BURCH, J. B.; AUGUSTINE, A. D.; FRIEDEN L. A.; HADLEY, E.; HOWCROFT, T. K.; JOHNSON, R.; ET AL. Advances in geroscience: impact on health span and chronic disease. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 69(Suppl1):S1-3.doi:10.1093/gerona/glu041, 2014.
- CAI, D. AND , T. Inflammatory cause of metabolic syndrome via brain stress and NF-κB. **Aging** (Albany NY). 4:98-115, 2012.
- CAMPISI, J. AND D'ADDA DI FAGAGNA, F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8:729-740, 2007.
- CECHELLA, J.L.; LEITE, M.R.; ROSARIO, A.R.; et al. Diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise enhance novel object recognition memory in old rats. **Age (Dordr)** 36: 9666, 2014.
- CHENG, E.H.Y.; KIRSCH, D.G.; CLEM, R.J.; RAVI, R.; KASTAN, M.B.; BEDI, A.; UENO, K.; HARDWICK, J.M. Conversion of Bcl2 to a Bax-like death effector by caspases. **Science** 278:1966-1968, 1997.
- CHEN, A.; XIONG, L.J.; TONG, Y.; MAO, M. Neuroprotective effect of brain-derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway. **Mol Med Rep** 2013 8:1011-1016.
- CHEN, T.T.; MAEVSKY, E.I., UCHITEL, M.L. Maintenance of homeostasis in the aging hypothalamus: the central and peripheral roles of succinate. **Front Endocrinol (Lausanne)** 2: 6-7, 2015.
- CHINTA, S.J.; WOODS, G.; RANE, A.; DEMARIA, M.; CAMPISI, J. AND ANDERSEN, J.K. Cellular senescence and the aging brain. **Exp Gerontol** 68:3-7, 2014.
- CINTI, S.; MITCHELL, G.; BARBATELLI, G.; MURANO, I.; CERESI, E.; FALOAIA, E.; WANG, S.; FORTIER, M.; GREENBERG, A.S. AND OBIN, M.S. ADIPOCYTE DEATH DEFINES MACROPHAGE LOCALIZATION AND FUNCTION IN ADIPOSE TISSUE OF OBESE MICE AND HUMANS. **J LIPID RES** 46:2347-2355, 2005.
- CLEM, R.J.; CHENG, E.H.Y.; KARP, C.L.; KIRSCH, D.G.; UENO, K.; TAKAHASHI, A.; KASTAN, M.B.; GRIFFIN, D.E.; EARNSHAW, W.C.; VELIUONA, M.A.; HARDWICK, J.M. Modulation of cell death by Bcl-XL through caspase interaction. **Proc Natl Acad Sci USA** 95:554-559, 1998.
- COLLADO, M.; BLASCO, M.A. AND SERRANO, M. Cellular senescence in cancer and aging. **Cell** 130:223-233, 2007.
- COLMAN, R.J.; ANDERSON, R.M.; JOHNSON, S.C.; KASTMAN, E.K.; KOSMATKA, K.J.; BEASLEY, T.M.; ALLISON, D.B.; CRUZEN, C.; SIMMONS, H.A.; KEMNITZ, J.W. AND WEINDRUCH, R. Caloric restriction delays disease onset and mortality in rhesus monkeys. **Science** 325:201-204, 2009.

- COTMAN C.W. The role of neurotrophins in brain aging: a perspective in honor of Regino Perez-Polo. **Neurochem Res** 30:877-881, 2005.
- CURRAN, J.E.; JOWETT, J.B.; ELLIOTT, K.S.; GAO, Y.; GLUSCHENKO, K.; WANG, J.; ABEL AZIM, D.M.; CAI, G.; MAHANEY, M.C.; COMUZZIE, A.G.; DYER, T.D.; WALDER, K.R.; ZIMMET, P.; MACCLUER, J.W.; COLLIER, G.R.; KISSEBAH, A.H.; BLANGERO, J. Genetic variation in selenoprotein S influences inflammatory response. *Nature Genetics* 37:1234-1241, 2005.
- DE FREITAS, A.S.; FUNCK, V.R.; ROTA MDOS, S.; et al. Diphenyl diselenide, a simple organoselenium compound, decreases methylmercury-induced cerebral, hepatic and renal oxidative stress and mercury deposition in adult mice. **Brain Res Bull** 79: 77-84, 2009.
- DE LUCA, B.; MONDA, M.; SULLO, A. Changes in eating behavior and thermogenic activity following inhibition of nitric oxide formation. **Am J Physiol** 268: R1533-8, 1995.
- DE VARGAS BARBOSA, N.B.; NOGUEIRA, C.W.; GUECHEVA, T.N.; et al. Diphenyl diselenide supplementation delays the development of N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors. **Arch Toxicol** 82: 655-63, 2008.
- DHANASEKARAN, D.N. AND REDDY, E.P. JNK signaling in apoptosis. **Oncogene** 27:6245-6251, 2008.
- DI IORIO, A.; FERRUCCI, L.; SPARVIERI, E.; CHERUBINI, A.; VOLPATO, S.; CORSI A.; ET AL . Serum IL-1beta levels in health and disease: a population-based study. 'The InCHIANTI study'. **Cytokine** 22: 198-205, 2003.
- DRENTH, J.P.; VAN UUM, S.H.; VAN DEUREN, M.; PESMAN, G.J.; VAN DER VEN JONGEKRUG, J. AND VAN DER MEER J. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production. **J Appl Physiol** 79: 1497-1503, 1995.
- DOBACHINSKI, F.; DA SILVA, M.H.; TASSI, C.L.; et al. Neuroprotective effect of diphenyl diselenide in a experimental stroke model: maintenance of redox system in mitochondria of brain regions. **Neurotox Res** 26: 317-30, 2014.
- DOWNWARD, J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. **Semin Cell Dev Biol** 15: 177-182, 2004.
- DU, K. AND MONTMINY, M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. **J Biol Chem** 273:32377-2379, 1998.
- DUNTAS, L.H. Selenium and inflammation: underlying anti-inflammatory mechanisms. **Horm Metab Res** 41:443-447, 2009.
- DYKSTRA, B.; OLTHOF, S.; SCHREUDER, J.; RITSEMA, M. AND DE HAAN, G. Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. **J. Exp. Med.** 208:2691-2703, 2011.
- EADIE, B. D.; REDILA, V. A. AND CHRISTIE B. R. Voluntary exercise alters the cytoarchitecture of the adult dentate gyrus by increasing cellular proliferation, dendritic complexity, and spine density. **J Comp Neurol** 486:39-47, 2005.

- EDGAR, D.; SHABALINA, I.; CAMARA, Y.; WREDENBERG, A.; CALVARUSO, M.A.; NIJTMANS, L.; NEDERGAARD, J.; CANNON, B.; LARSSON, N.G. AND TRIFUNOVIC, A. Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. **Cell Metab** 10:131-138, 2009.
- EFEYAN, A.; COMB, W.C. AND SABATINI, D.M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. **Nature** 517:302-10, 2015.
- FEBBRAIO, M.A. AND PEDERSEN, B.K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **FASEB J** 16: 1335-1347, 2002.
- FERRARESE, C.; MASCARUCCI, P.; ZOIA, C.; CAVARRETTA, R.; FRIGO, M.; BEGNI B.; ET AL. Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. **J Cereb Blood Flow Metab** 19:1004-9, 1999.
- FINKBEINER, S. CREB couples neurotrophin signals to survival messages. **Neuron** 25:11-14, 2000.
- FLORES, I.; CAYUELA, M.L. AND BLASCO, M.A. Effects of telomerase and telomere length on epidermal stem cell behavior. **Science** 309:1253-1256, 2005.
- FONTANA, L.; PARTRIDGE, L. AND LONGO, V.D. Extending healthy lifespan-from yeast to humans. **Science** 328:321-326, 2010.
- FRAGA, M.F., AND ESTELLER, M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. **Trends Genet** 23:413-418, 2007.
- FRANCESCHI, C.; BONAFE, M.; VALENSIN, S.; OLIVIERI, F.; DE LUCA, M.; OTTAVIANI, E.; ET AL. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Ann N Y Acad Sci** 908:244-254, 2000.
- FRANCESCHI, C. AND CAMPISI J. Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 69:4-9, 2014.
- FRASCA, D.; DIAZ, A.; ROMERO, M.; LANDIN, A.M. AND BLOMBERG, B.B. Age effects on B cells and humoral immunity in humans. **Ageing Res. Rev.** 10:330-335, 2011.
- FREUND, A.; ORJALO, A.V.; DESPREZ, P.Y. AND CAMPISI, J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. **Trends Mol Med** 16:238-246, 2010.
- FRIED, S.K.; BUNKIN, D.A. AND GREENBERG, A.S. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. **J Clin Endocrinol Metab** 83:847-850, 1998.
- FULLE, S.; PROTASI, F.; DI TANO, G.; ET AL. The contribution of reactive oxygen species to sarcopenia and muscle ageing. **Exp Gerontol** 39:17-24, 2004.
- FUMAGALLI, M.; ROSSIELLO, F.; CLERICI, M.; BAROZZI, S.; CITTARO, D.; KAPLUNOV, J.M.; BUCCI, G.; DOBREVA, M.; MATTI, V.; BEAUSEJOUR, C.M.; ET AL. Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. **Nat Cell Biol** 14:355-365, 2012.

- GALLEY HF, DAVIES MJ, WEBSTER NR. Xantine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. **Crit Care Med** 24:1649-1653, 1996.
- Garatachea, N.; Pareja-Galeano, H.; Sanchis-Gomar, F.; Santos-Lozano, A.; Fiuza-Luces, C.; Morán, M.; Emanuele, E.; Joyner, M.J.; Lucia, A. Exercise attenuates the major hallmarks of aging. **Rejuvenation Res** 18:57-89, 2015.
- GEMECHU, J.M. AND BENTIVOGLIO, M. T Cell Recruitment in the Brain during Normal Aging. **Front. Cell. Neurosci.** 6:38, 2012.
- GLEESON, M.; MCFARLIN, B.; FLYNN, M. Exercise and Toll-like receptors. **Exerc Immunol Rev** 12:34-53, 2006.
- GHOSH, S.; LERTWATTANARAK, R.; GARDUÑO JDE, J.; GALEANA, J.J.; LI, J.; ZAMARRIPA, F.; LANCASTER, J.L.; MOHAN, S.; HUSSEY, S.; MUSI, N. Elevated muscle TLR4 expression and metabolic endotoxemia in human aging. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 70:232-46, 2014.
- GHISLENI, G.; PORCIUNCULA, L.O.; CIMAROSTI, H.; et al. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. **Brain Res** 986: 196-9, 2003.
- GHISLENI, G.; PORCIUNCULA, L.O.; MIORANZZA, S.; et al. Selenium compounds counteract the stimulation of ecto-nucleotidase activities in rat cultured cerebellar granule cells: putative correlation with neuroprotective effects. **Brain Res** 1221: 134-40, 2008.
- GLASER, V.; MARTINS RDE, P.; VIEIRA, A.J.; et al. Diphenyl diselenide administration enhances cortical mitochondrial number and activity by increasing hemeoxygenase type 1 content in a methylmercury-induced neurotoxicity mouse model. **Mol Cell Biochem** 390: 1-8, 2014.
- GENDELMAN, H. Neural immunity: Friend or foe? **J Neurovirol** 8:474-479, 2002.
- GOLDHAMMER, E.; TANCHILEVITCH, A.; MAOR, I.; BENIAMINI, Y.; ROSENSCHEIN, U.; SAGIV, M. Exercise training modulates cytokines activity in coronary heart disease patients. **Int J Cardiol** 100:93-99, 2005.
- GOLDBERG, A.D.; ALLIS, C.D. AND BERNSTEIN, E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 128:635-8, 2007.
- GOMES DA SILVA S.; SIMÕES, P.S.; MORTARA, R.A.; SCORZA, F.A.; CAVALHEIRO, E.A.; DA GRAÇA NAFFAH-MAZZACORTTI, M.; ARIDA, R.M. Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats. *J Neuroinflammation* 10:61, 2013.
- GOMEZ-CABRERA, M.C.; DOMENECH, E. AND VINA J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. **Free Radic Biol Med** 44:126-131, 2008.
- GREEN, D.R.; GALLUZZI, L. AND KROEMER, G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. **Science** 333:1109-1112, 2011.

- HAMMETT CJ, OXENHAM HC, BALDI JC, DOUGHTY RN, AMERATUNGA R, FRENCH JK, ET AL. Effect of six months' exercise training on C-reactive protein levels in healthy elderly subjects. **J Am Coll Cardiol** 44:2411-2413, 2004.
- HAN, S. AND BRUNET, A. Histone methylation makes its mark on longevity. **Trends Cell Biol** 22: 42-49, 2012.
- HANADA, M.; FENG, J. AND HEMMINGS, B.A. Structure, regulation and function of PKB/AKT - a major therapeutic target. **Biochim Biophys Acta** 1697: 3-16, 2004.
- HARMAN, D. The free radical theory of aging: effect of age on serum copper levels. **J Gerontol** 20:151-153, 1965.
- HEARPS, A.C.; MARTIN, G.E.; ANGELOVICH, T.A.; CHENG, W.J.; MAISA, A.; LANDAY, A. L.; ET AL. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. **Aging Cell** 11:867-875, 2012.
- HIONA, A.; SANZ, A.; KUJOTH, G.C.; PAMPLONA, R.; SEO, A.Y.; HOFER, T.; SOMEYA, S.; MIYAKAWA, T.; NAKAYAMA, C.; SAMHAN-ARIAS, A.K.; ET AL. Mitochondrial DNA mutations induce mitochondrial dysfunction, apoptosis and sarcopenia in skeletal muscle of mitochondrial DNA mutator mice. **PLoS ONE** 5,e11468, 2010.
- HOOGLAND, I.C.; HOUBOLT, C.; VAN WESTERLOO, D.J.; VAN GOOL, W.A.; VAN DE BEEK, D. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. **J Neuroinflammation** 12:114, 2015.
- Horrillo, D.; Sierra, J.; Arribas, C.; Garcia-San Frutos, M.; Carrascosa, J.M.; Lauzurica, N.; Fernandez-Agullo, T. and Ros, M. Age-associated development of inflammation in Wistar rats: Effects of caloric restriction. **Arch Physiol Biochem** 117:140-150, 2011.
- HORT, M.A.; STRALIOTTO M.R.; NETTO P.M.; DA ROCHA J.B.T.; DE BEM A.F. AND RIBEIRO-DO-VALLE R.M. Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr -/- mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. **J Cardiovasc Pharmacol** 58:91-101, 2011.
- HOEIJMAKERS, J.H. DNA damage, aging, and cancer. **N Engl J Med** 361:1475-1485, 2009.
- HUANG, Z.; ROSE, A.H. AND HOFFMANN P.R. The Role of Selenium in Inflammation and Immunity: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. **Antioxid Redox Signal**. 16:705-743, 2012.
- HORT, M.A.; STRALIOTTO, M.R.; NETTO, P.M.; et al. Diphenyl diselenide effectively reduces atherosclerotic lesions in LDLr -/- mice by attenuation of oxidative stress and inflammation. **J Cardiovasc Pharmacol** 58: 91-101, 2011.
- HARKINS, J.M.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CHUNG, Y.J.; PENNER, K.M.; PESTKA, J.J.; NORTH, C.M. AND CLAYCOMBE, K.J. Expression of interleukin-6 is greater in preadipocytes than in adipocytes of 3T3-L1 cells and C57BL/6J and ob/ob mice. **J Nutr** 134: 2673-2677, 2004.
- HAYFLICK, L. AND MOREHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp Cell Res** 25: 585-621, 1961.

- HEWITT, G.; JURK, D.; MARQUES, F.D.; CORREIA-MELO, C.; HARDY, T.; GACKOWSKA, A.; ANDERSON, R.; TASCHUK, M.; MANN, J. AND PASSOS, J.F. Telomeres are favoured targets of a persistent DNA damage response in ageing and stress-induced senescence. **Nat Commun** 3:708, 2012.
- HIPP, M.S.; BERSUKER, K.; KOPITO, R.R. Live-cell imaging of ubiquitin-proteasome system function. **Methods Mol Biol** 832:463-72, 2012.
- ISAACS, K. R. ANDERSON, B. J. ALCANTARA, A. A. BLACK, J. E. AND GREENOUGH, W. T. Exercise and the brain: angiogenesis in the adult rat cerebellum after vigorous physical activity and motor skill learning. **J Cereb Blood Flow Metab** 12:110-119, 1992.
- JOHNSON, B.W. AND BOISE, L.H. Bcl2 and caspase inhibition cooperate to inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cell death in a Bcl2 cleavage-independent fashion. **J Biol Chem** 274:18552-18558, 1999.
- JUNG, K.J.; LEE, E.K.; YU, B.P. AND CHUNG, H.Y. Significance of protein tyrosine kinase/protein tyrosine phosphatase balance in the regulation of NF- $\kappa$ B signaling in the inflammatory process and aging. **Free Radic Biol Med** 47:983-991, 2009.
- KAZAK, L.; REYES, A. AND HOLT, I.J. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. **Nat Rev Mol Cell Biol** 13: 659-671, 2012.
- KELLEY, G.A. AND KELLEY, K.S. Effects of aerobic exercise on C-reactive protein, body composition, and maximum oxygen consumption in adults: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Metabolism** 55:1500-1507, 2006.
- KENYON, C.J. The genetics of ageing. **Nature** 464:504-512, 2010.
- KLASS, M.R. A method for the isolation of longevity mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans* and initial results. **Mech Ageing Dev** 22: 279-286, 1983.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L. AND BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol Rev** 87:99-163, 2007.
- JANZEN, V.; FORKERT, R.; FLEMING, H.E.; SAITO, Y.; WARING, M.T.; DOMBKOWSKI, D.M.; CHENG, T.; DE PINHO, R.A.; SHARPLESS, N.E. AND SCADDEN, D.T. Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. **Nature** 443:421-426, 2006.
- KUILMAN, T.; MICHALOGLOU, C.; MOOI, W.J.; AND PEEPER, D.S. The essence of senescence. **Genes Dev** 24:2463-2479, 2010.
- LARSEN, P.R.; KRONENBERG, H.R.; MELMED, S.; POLONSKY, K.S. Williams Text book of Endocrinology. 10<sup>th</sup> ed. St. Louis, MO: Larsen Saunders/Elsevier, 2003.
- LAPLANTE, M. AND SABATINI, D.M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell** 149:274-293, 2012.
- LLEDO, P.; ALONSO, M. AND GRUBB M. S. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. **Nat Revi Neurosci** 7:179-193, 2006.

- LE GARFF-TAVERNIER, M.; BEZIAT, V.; DECOCQ, J.; SIGURET, V.; GANDJBAKHCH, F.; PAUTAS, E., ET AL. Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the lifespan. *Aging Cell* 9:527-535, 2010.
- LAPCHAK, P.A.; ARAUJO, D.M.; HEFTI, F. Systemic interleukin-1 beta decreases brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 53:297-301, 1993.
- LIM, C.T.; GROSSMAN, A.; KHOO, B. Normal physiology of ACTH and GH release in the hypothalamus and anterior pituitary in man. In: Grossman A, editor. *Pituitary Disease and Neuroendocrinology*. South Dartmouth, MA:MD Text.com, Inc. Available from: <http://www.endotext.org/section/neuroendo/>, 2014.
- LISTA, I. AND SORRENTINO, G. Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. *Cellular and Molecular Neurobiology* 30:493-503, 2010.
- LEITE, M.R.; MARCONDES SARI, M.H.; DE FREITAS, M.L.; et al. Caffeine and diphenyl diselenide improve long-term memory impaired in middle-aged rats. *Exp Gerontol* 53: 67-73, 2014.
- LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M.A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The hallmarks of aging. *Cell* 153:1194-217, 2013.
- LORD, C.J. AND ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* 481:287-294, 2012.
- LUCHESI, C.; STANGHERLIN, E.C.; GAY, B.M.; et al. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: involvement of glutathione. *Ecotoxicol Environ Saf* 72: 248-54, 2009.
- MARCELL, T.J.; MCAULEY, K.A.; TRAUSTADOTTIR, T.; REAVEN, P.D. Exercise training is not associated with improved levels of C-reactive protein or adiponectin. *Metabolism* 54:533-541, 2005.
- MATSUE, H.; EDELBAUM, D.; SHALHEVET, D.; MIZUMOTO, N.; YANG, C.; MUMMERT, M.E.; OEDA, J.; MASAYASU, H.; TAKASHIMA, A. Generation and function of reactive oxygen species in dendritic cells during antigen presentation. *J Immunol* 171:3010-3018, 2003.
- MATTHYS, P.; MITERA, T.; HEREMANS, H.; VAN DAMME, J. AND BILLIAU, A. Anti-gamma interferon and anti-interleukin-6 antibodies affect staphylococcal enterotoxin B-induced weight loss, hypoglycemia, and cytokine release in D-galactosamine-sensitized and unsensitized mice. *Infect Immun* 63:1158-1164, 1995.
- MATTISON, J.A.; ROTH, G.S.; BEASLEY, T.M.; TILMONT, E.M.; HANDY, A.M.; HERBERT, R.L.; LONGO, D.L.; ALLISON, D.B.; YOUNG, J.E.; BRYANT, M.; ET AL. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature* 489:318-321, 2012.
- McFARLIN, B.K.; FLYNN, M.G.; CAMPBELL, W.W.; ET AL. Physical activity status, but not age, influences inflammatory biomarkers and toll-like receptor 4. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61:388-393, 2006.



- MELMED, S.; POLONSKY, K.S.; LARSEN, P.R.; KRONENBERG, H.M. **Williams Text book of Endocrinology**. 12<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2013.
- MELO, M.T.; DE OLIVEIRA, I.M.; GRIVICICH, I.; et al. Diphenyl diselenide protects cultured MCF-7 cells against tamoxifen-induced oxidative DNA damage. **Biomed Pharmacother** 67: 329-35, 2013.
- MERAZ-RIOS, M. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. **Frontiers in Integrative Neuroscience** 7:59, 2013.
- MIZUHARA, H.; O'NEILL, E.; SEKI, N.; OGAWA, T.; KUSUNOKI, C.; OTSUKA, K. SATOH, S.; NIWA, M.; SENOH, H. AND FUJIWARA, H. T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. **J Exp Med** 179: 1529-1537, 1994.
- MORETTO, M.B.; FUNCHAL, C.; ZENI, G.; et al. Selenium compounds prevent the effects of methylmercury on the in vitro phosphorylation of cytoskeletal proteins in cerebral cortex of young rats. **Toxicol Sci** 85: 639-46, 2005a.
- MORETTO, M.B.; FUNCHAL, C.; ZENI, G.; et al. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. **Toxicology** 210: 213-22, 2005b.
- MOSKALEV, A.A.; SHAPOSHNIKOV, M.V.; PLYUSNINA, E.N.; ZHAVORONKOV, A.; BUDOVSKY, A.; YANAI, H. AND FRAIFELD, V.E. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. **Ageing Res Rev** <http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.001>, 2012.
- NARAJI, C.; KARVEKAR, M.D.; DAS, A.K. Biological importance of organoselenium compounds **Indian J Pharm Sci** 69: 344-351, 2007.
- NELSON, G.; WORDSWORTH, J.; WANG, C.; JURK, D.; LAWLESS, C.; MARTIN-RUIZ, C. AND VON ZGLINICKI, T. A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence. **Aging Cell** 11:345-349, 2012.
- NOGUEIRA, C.W.; QUINHONES, E.B.; JUNG, E.A.; et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of diphenyl diselenide. **Inflamm Res** 52: 56-63, 2003.
- NOLAN, Y.; VEREKER, E.; LYNCH, A.M.; LYNCH, M.A. Evidence that lipopolysaccharide-induced cell death is mediated by accumulation of reactive oxygen species and activation of p38 in rat cortex and hippocampus. **Exp Neurol** 184:794-804, 2003.
- OLOVNIKOV, A.M.. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. **Exp Gerontol** 31: 443-448, 1996.
- OKITA, K.; NISHIJIMA, H.; MURAKAMI, T.; NAGAI, T.; MORITA, N.; YONEZAWA, K.; ET AL. Can exercise training with weight loss lower serum C-reactive protein levels? **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 24:1868-1873, 2004.
- OSTROWSKI, K.; SCHJERLING, P. AND PEDERSEN B.K. Physical activity and plasma interleukin-6 in humans-effect of intensity of exercise. **Eur J Appl Physiol** 83:512-515, 2000.

- OVADYA, Y. AND KRIZHANOVSKY, V. Senescent cells: SASpected drivers of age-related pathologies. **Biogerontology** 15:627-642, 2014.
- PALMIER, C. Selenium reagents and intermediates. **Organic synthesis Pergamon**, Oxford, 1986.
- PEDERSEN, B.K. AND HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: regulation, integration and adaptation. **Physiol Rev** 80: 1055-1081, 2000.
- PETERSEN, A.M. AND PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol** 98:1154-1162, 2005.
- PEDERSEN, B. K. AND SALTIN, B. Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports** 16:3-63, 2006.
- POSSER, T.; FRANCO, J.L.; DOS SANTOS, D.A.; et al. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. **Brain Res** 1199: 138-47, 2008.
- POWERS, E.T.; MORIMOTO, R.I.; DILLIN, A.; KELLY, J.W. AND BALCH, W.E. Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. **Annu Rev Biochem** 78: 959-991, 2009.
- PRIGOL, M.; BRÜNING C.A.; ZENI, G. AND NOGUEIRA C.W. Protective effect of disubstituted diaryl diselenides on cerebral oxidative damage caused by sodium nitroprusside. **Biochem Eng J** 45:94-99, 2009.
- PUGH, C.R.; KUMAGAWA, K.; FLESHNER, M.; WATKINS, L.R.; MAIER, S.F.; RUDY, J.W. Selective effects of peripheral lipopolysaccharide administration on contextual and auditory-cue fear conditioning. **Brain Behav Immun** 12:212-229, 1998.
- PURKAYASTHA S., CAI, D. Neuroinflammatory basis of metabolic syndrome. **Mol Metab** 2:356-363, 2013.
- RAETZ, C. R. AND WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem** 71:635-700, 2002.
- RADAK, Z.; CHUNG, H.Y.; GOTO S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. **Biogerontology** 6:71-75, 2005.
- RANDO, T.A. AND CHANG, H.Y. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. **Cell** 148:46-57, 2012.
- ROA, J; HERBISON, A.E. Direct regulation of GnRH neuron excitability by arcuate nucleus POMC and NPY neuron neuropeptides in female mice. **Endocrinology** 153:5587-99, 2012.
- RODIER, F.; CAMPISI, J. Four faces of cellular senescence. **J Cell Biol** 192:547-556, 2011.
- ROPELLE, E.R.; FLORES, M.B.; CINTRA, D.E.; ROCHA, G.Z.; PAULI, J.R.; MORARI, J.; DE SOUZA, C.T.; MORAES, J.C., PRADA, P.O.; GUADAGNINI, D.; ET AL. IL-6 and IL-10

anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. **PLoS. Biol.** ;8(8). pii: e1000465, 2010.

- ROSA, R.M.; FLORES, D.G.; APPELT, H.R.; et al. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. **Neurosci Lett** 341: 217-20, 2003.
- ROSSI, D.J.; BRYDER, D.; SEITA, J.; NUSSENZWEIG, A.; HOEIJMAKERS, J. AND WEISSMAN, I.L. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. **Nature** 447:725-729, 2007.
- RUPIL, L.L.; DE BEM, A.F.; ROTH, GA. Diphenyl diselenide-modulation of macrophage activation: down-regulation of classical and alternative activation markers. **Innate Immun** 18:627-37, 2012.
- RUSSELL, S.J. AND KAHN, C.R. Endocrine regulation of ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8: 681-691, 2007.
- SARMA, J.V. Microglia-mediated neuroinflammation is an amplifier of virus-induced neuropathology. **J Neurovirol** 20: 122-136, 2014.
- SALMINEN, A.; HUUSKONEN, J.; OJALA, J.; KAUPPINEN, A.; KAARNIRANTA, K.; SUURONEN, T. Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. **Ageing Res Rev** 7:83-105, 2008.
- SALMINEN, A.; KAARNIRANTA, K. AND KAUPPINEN, A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. **Ageing** (Albany NY) 4:166-175, 2012.
- SALVIOLI, S.; CAPRI, M.; VALENSIN, S.; TIERI P.; MONTI D.; OTTAVIANI, E. AND FRANCESCHI C. Inflamm-Aging, Cytokines and Aging: State of the Art, New Hypotheses on the Role of Mitochondria and New Perspectives from Systems Biology. **Current Pharmaceutical Design** 12:3161-3171, 2006.
- SAVEGNAGO, L.; JESSE, C.R.; PINTO, L.G.; ROCHA, J.B.T. AND NOGUEIRA, C.W. Diphenyl diselenide attenuates acute thermal hyperalgesia and persistent inflammatory and neuropathic pain behavior in mice. **Brain Res** 1175:54-59, 2007.
- SAVEGNAGO, L.; JESSE, C.R.; PINTO, L.G.; et al. Diphenyl diselenide exerts antidepressant-like and anxiolytic-like effects in mice: involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway in its antidepressant-like action. **Pharmacol Biochem Behav** 88: 418-26, 2008.
- SAVEGNAGO, L.; TREVISAN, M.; ALVES, D.; et al. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ Toxicol Pharmacol** 21: 86-92, 2006.
- SCHINDLER, R.; MANCILLA, J.; ENDRES, S.; GHORBANI, R.; CLARK, S.C. AND DINARELLO, C.A. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. **Blood** 75:40-47, 1990.
- SHARPLESS, N.E. AND DE PINHO, R.A. How stem cells age and why this makes us grow old. **Nat Rev Mol Cell Biol** 8:703-713, 2007.

- SHIMOHASHI, N.; NAKAMUTA, M.; UCHIMURA, K.; SUGIMOTO, R.; IWAMOTO, H.; ENJOJI, M.; NAWATA, H. Selenoorganic compound, ebselen, inhibits nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production by the modulation of jun-N-terminal kinase and the NF-kappaB signaling pathway in rat Kupffer cells. **J Cell Biochem** 78:595-606, 2000.
- SHIN K.M.; SHEN, L. AND PARK, S.J. Bis-(3-hydroxyphenyl) diselenide inhibits LPS stimulated iNOS and COX-2 expression in RAW 264.7 macrophage cells through the NF-kappaB inactivation. **J Pharm Pharmacol** 61:479-486, 2009.
- SOUZA, A.C.; BRUNING, C.A.; LEITE, M.R.; et al. Diphenyl diselenide improves scopolamine-induced memory impairment in mice. **Behav Pharmacol** 21: 556-62, 2010.
- STANGHERLIN, E.C.; LUCHESE, C.; PINTON, S.; et al. Sub-chronical exposure to diphenyl diselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats. **Brain Res** 1201: 106-13, 2008.
- STARKIE, R.; OSTROWSKI, S.R.; JAUFFRED, S.; FEBBRAIO, M. AND PEDERSEN, B.K. Exercise and IL-6 infusion inhibit endotoxin-induced TNF- $\alpha$  production in humans. **Faseb J** 17:884-886, 2003.
- TANG, Y.; CAI, D. Hypothalamic inflammation and GnRH in aging development. **Cell Cycle** 12:2711-2, 2013.
- TANSEY, M. Neuroinflammation and Non-motor Symptoms: The Dark Passenger of Parkinson's Disease? **Curr Neurol Neurosci Rep** 12:350-358, 2012.
- T' HART, B.; WILFRED D. Commentary on Special Issue: CNS Diseases and the Immune System. **J Neuroimmune Pharmacol** 8:757-759, 2013.
- TILSTRA, J.S.; CLAUSON, C.L.; NIEDERNHOFER, L.J.; ROBBINS, P.D. NF- $\kappa$ B in Aging and Disease. **Aging Dis** 2:449-465, 2011.
- VAN PRAAG, H.; SHUBERT, T.; ZHAO, C. AND GAGE F. H. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **J Neurosci** 25:8680-8685, 2005.
- VIEIRA, V.J.; VALENTINE, R.J.; WILUND, K.R.; ANTAO, N.; BAYNARD, T. AND WOODS, J.A. Effects of exercise and low-fat diet on adipose tissue inflammation and metabolic complications in obese mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 296:1164-1171, 2009.
- VIEIRA, V.J.; VALENTINE, R.J., WILUND, K.R. AND WOODS, J.A. Effects of diet and exercise on metabolic disturbances in high-fat diet-fed mice. **Cytokine** 46: 339-345, 2009.
- VIÑA J, GOMEZ-CABRERA MC, BORRAS C, FROIO T, SANCHIS-GOMAR F, MARTINEZ-BELLO VE, PALLARDO FV. Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009;61:1369-74.
- WEINDRUCH, R. AND WALFORD, R. L. The retardation of aging and disease by dietary restriction. (Springfield, IL:Charles C. Thomas), 1988.
- WEI J, XU H, DAVIES JL, HEMMINGS GP. Increase of plasma IL-6concentration with age in healthy subjects. **Life Sci** 51: 1953-1956, 1992.

- WEINERT, B. T. AND TIMIRAS, P. S. Theories of aging. **J Appl Physiol** 95, 1706-1716, 2003.
- WELLHAUSER, L; GOJSKA, N.M.; BELSHAM, D.D. Delineating the regulation of energy homeostasis using hypothalamic cell models. **Front Neuroendocrinol** 36:130-49, 2014.
- WEN, A.Y.; SAKAMOTO, K.M.; MILLER, L.S. The role of the transcription factor CREB in immune function. **J Immunol** 185:6413-6419, 2010.
- WERNER, C.; FURSTER, T.; WIDMANN, T.; POSS, J.; ROGGIA, C.; HANHOUN, M.; ET AL. Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. **Circulation** 120:2438-47, 2009.
- WRONA, D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. **J. Neuroimmunol.** 172, 38-58, 2006.
- WORMAN, H.J. Nuclear lamins and laminopathies. **J Pathol** 226:316-325, 2012.
- WOOD, S.M.; BECKHAM, C.; YOSIOKA, A.; DARBAN, H.; WATSON, R.R. beta- Carotene and selenium supplementation enhances immune response in aged humans. **Integr Med** 2:85-92, 2000.
- WU, D.; REN, Z.; PAE, M.; GUO, W.; CUI, X.; MERRILL, A.H. AND MEYDANI, S.N. Aging up-regulates expression of inflammatory mediators in mouse adipose tissue. **J Immunol** 179: 4829-4839, 2007.
- XU, H.; BARNES, G.T.; YANG, Q.; TAN, G.; YANG, D.; CHOU, C.J.; SOLE, J.; NICHOLS, A.; ROSS, J.S.; TARTAGLIA, L.A. AND CHEN, H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest** 112: 1821-1830, 2003.
- YI, C.X.; AL-MASSADI, O.; DONELAN, E.; LEHTI, M.; WEBER, J.; RESS, C.; TRIVEDI, C.; MÜLLER T.D.; WOODS, S.C. AND HOFMANN, S.M. Exercise protects against high-fat diet-induced hypothalamic inflammation. **Physiol Behav** 106:485-490, 2012.
- ZINK, A.N.; PEREZ-LEIGHTON, C.E.; KOTZ, C.M. Orexin neuropeptide system: physical activity and hypothalamic function throughout the aging process. **Front Syst Neurosci** 8:211, 2014.
- ZHANG, G.; LI, J.; PURKAYASTHA, S.; TANG, Y.; ZHANG, H.; YIN, Y.; LI, B.; LIU, G. AND CAI, D. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-b, NF-kB and GnRH. **Nature** 497:211-216, 2013.