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

**José Luiz Cechella Júnior**

# EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM DISSELENETO DE DIFENILA E DO EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO NA MEMÓRIA DE RATOS WISTAR VELHOS

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2017**

**José Luiz Cechella Júnior**

# EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM DISSELENETO DE DIFENILA E DO EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO NA MEMÓRIA DE RATOS WISTAR VELHOS

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

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

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2017**

**José Luiz Cechella Júnior**

# EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM DISSELENETO DE DIFENILA E DO EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO NA MEMÓRIA DE RATOS WISTAR VELHOS

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

**Aprovado em 03 de março de 2017:**

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

_____
**Luiz Fernando Freire Royes, Dr.** (UFSM)

_____
**Edilamar Menezes de Oliveira, Dr.ª** (USP)

_____
**Marina Prigol, Dr.ª** (UNIPAMPA, Campus Itaqui)

_____
**Felipe Pivetta Carpes, Dr.** (UNIPAMPA, Campus Uruguaiana)

Santa Maria, RS
2017

# DEDICATÓRIA

*Dedico esta tese a minha família,*
*obrigado.*

# AGRADECIMENTOS

*Primeiramente Agradeço a Deus por me guiar estes anos.*
*A minha família pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nas horas mais difíceis da minha vida.*
*Aos meus orientadores Prof. GZ e Profª Cristina pelo exemplo de profissionais, pela compreensão. Sem vocês eu não teria conhecido este mundo, mundo cientifico, pelo qual me apaixonei e sem vocês eu não estaria onde eu estou hoje.Muito obrigado de coração pelo apoio em todos os momentos.*
*Agradecimento muito especial à minha namorada Marcia, obrigado por me fazer sorrir e feliz, por mostrar-me que podemos ser felizes sendo nós mesmos, obrigado pelo carinho, pelo incentivo, pelo companheirismo e a compreensão e por me dar dois filhos (piá e guri) que amo muito. Te Adoro Muito meu bem!!! Agradeço todos os dias por ter te encontrado.*
*À minha sogra e sogro pelo apoio e incentivo nos dias de preparação desta tese.*
*Agradecimento à família Nogueira, obrigado pelo apoio.*
*A todos os alunos do LABIOEX pela amizade e pelo auxilio.*
*Aos colegas do Laboratório, Carol, Marcel, Carolzinha, Bruna, Gláubia, Dani, Fran, Vavá, Suelen, Carla, Vini, Sabrina, Pietro, PC, Suzan e Ana Paula, pelos diversos momentos que compartilhamos.*
*Um agradecimento especial ao Marlon, Simone e Nati, a quem devo muito a concretização desta tese e pela a grande amizade.*
*Aos colegas César, Fernando, Rogério por quem tenho uma imensa amizade.*
*Aos colegas do Lab GZ, pelos grandes e bons momentos em todos esses anos de laboratório.*
*Aos professores desta banca, 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.*

***"A verdadeira medida de um homem não é como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas como ele se mantém em tempos de controvérsia e desafio"***

***Martin Luther King Jr.***

# RESUMO

# EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM DISSELENETO DE DIFENILA E DO EXERCÍCIO FÍSICO DE NATAÇÃO NA MEMÓRIA DE RATOS WISTAR VELHOS

Autor: José Luiz Cechella Júnior

Orientador: Gilson Rogério Zeni

O envelhecimento ocorre em todos os níveis celulares do organismo, sendo definido como um processo degenerativo, progressivo e irreversível. Uma característica importante do processo de envelhecimento é a perda gradual da memória. Dada a escassez de medidas terapêuticas efetivas para o déficit de memória no envelhecimento, uma importante tendência de investigação científica é a pesquisa de novos compostos com propriedades neuroprotetoras. Um desses compostos é o disseleneto de difenila, $(PhSe)_2$, um composto orgânico de selênio que tem demonstrado diversas propriedades farmacológicas. Além disto, estudos comportamentais realizados em animais indicam que o exercício físico é benéfico para a memória e o aprendizado. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação da suplementação de $(PhSe)_2$(1 ppm na ração, durante 1 mês) e do exercício físico aeróbico de natação (20 minutos por dia, 5 dias por semana, durante 5 semanas, sendo as 4 últimas, com uma sobrecarga de 3% do peso corporal) nos testes de memória de curta e longa duração, na memória espacial e nas proteínas neurotróficas responsáveis pela modulação da memória e da transmissão sináptica em ratos *Wistar* velhos. Os resultados apresentados no primeiro estudo demonstraram que tanto o composto $(PhSe)_2$ quanto o exercício de natação e a associação dos dois possuem efeitos em prevenir o declínio cognitivo causado pelo envelhecimento e de aumentar os níveis de CREB fosforilado, porém, o grupo exercício não melhorou a memória de longa duração, mas foi eficaz em melhorar a memória espacial e aumentar a fosforilação de Akt. Fatores envolvidos na neuroproteção, proliferação, diferenciação, sobrevivência celular e plasticidade sináptica como mBDNF, PKc, ERK investigados no manuscrito 1 nesta tese, foram aumentados em hipocampo de ratos velhos pelo exercício, e pela suplementação com $(PhSe)_2$ mais exercício de natação. A suplementação sozinha não aumentou os níveis ERK. A combinação da suplementação com o $(PhSe)_2$ e o exercício de natação foi eficaz em reduzir a apoptose hipocampal de ratos velhos, verificado através da análise dos níveis de caspase 3 clivada e PARP clivada. Reforçando o efeito anti-apoptótico do $(PhSe)_2$ e do exercício de natação, os níveis de Bcl2 e NeuN foram aumentados. Estes resultados demonstram os efeitos benéficos da suplementação com $(PhSe)_2$ e exercício de natação sobre modificações ocasionadas pelo envelhecimento.

**Palavras – chave:** envelhecimento, disseleneto de difenila, memória, exercício físico.

**ABSTRACT**

# EFFECTS OF DIPHENYL DISELENIDE SUPPLEMENTED DIET AND SWIMMING EXERCISE OF SWIMMING IN THE MEMORY OF AGED RATS WISTAR

Author: José Luiz Cechella Júnior
Advisor: Gilson Rogério Zeni

Aging occurs at all cellular levels of the body, being defined as a degenerative, progressive and irreversible process. An important feature of the aging process is the gradual loss of memory. Given the scarcity of effective therapeutic measures for memory deficit in aging, an important trend of scientific research is the search for new compounds with neuroprotective properties. One such compound is diphenyl diselenide, $(PhSe)_2$, an organic compound of selenium which has demonstrated various pharmacological properties. In addition, behavioral studies in animals indicate that physical exercise is beneficial for memory and learning. The objective of this study was to evaluate the effect of the association of the supplementation of $(PhSe)_2$ (1 ppm in the ration, during 1 month) and the aerobic physical exercise of swimming (20 minutes per day, 5 days per week, during 5 weeks, being The last 4, with an overload of 3% of body weight) on short and long term memory tests, spatial memory and neurotrophic proteins responsible for memory modulation and synaptic transmission in old Wistar rats. The results presented in the first study demonstrated that both the compound $(PhSe)_2$ and the swimming exercise and the association of the two have effects in preventing the cognitive decline caused by aging and increasing the levels of phosphorylated CREB; however, the exercise group did not Improved long-term memory, but was effective in improving spatial memory and enhancing Akt phosphorylation. Factors involved in neuroprotection, proliferation, differentiation, cell survival and synaptic plasticity such as mBDNF, PKc, ERK investigated in manuscript 1 in this thesis were increased in hippocampus from old rats by exercise, and by supplementation with $(PhSe)_2$ plus swimming exercise. Supplementation alone did not increase ERK levels. The combination of $(PhSe)_2$ supplementation and swimming exercise was effective in reducing hippocampal apoptosis of old rats, ascertained by analyzing the levels of cleaved caspase 3 and cleaved PARP. Reinforcing the anti-apoptotic effect of $(PhSe)_2$ and swimming exercise, Bcl2 and NeuN levels were increased. These results demonstrate the beneficial effects of $(PhSe)_2$ supplementation and swimming exercise on modifications caused by aging.

**Keywords:** Aging. diphenyl diselenide, memory, exercise.

# LISTA DE FIGURAS E TABELAS


| | | |
|---|---|---|
| Figura 1 | Receptor do mBDNF e suas vias de sinalização. | 19 |
| Figura 2 | Receptor do proBDNF e suas vias de sinalização. | 22 |
| Figura 3 | Estrutura química do Disseleneto de Difenila. | 26 |

# LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---|---|
| $(PhSe)_2$ | Disseleneto de difenila |
| AMPK | Quinase dependente de AMP |
| APaf-1 | Proteína ativadora |
| Akt | Serina/treonine proteína cinase |
| Bad | Sinal de morte associado ao Bcl2 |
| Bax | Glutamina sintetase |
| Bcl2 | Do ingles B-cell lymphoma 2 |
| $BCL\text{-}X_L$ | Do inglês B-cell lymphoma-extra large |
| BDNF | Fator neurotrófico derivado do cérebro |
| Bim | Proteína 11 semelhante ao Bcl2 |
| CAMK | $Ca^{2+}$/Calmodulina dependente de proteína cinase |
| CAMKII | $Ca^{2+}$/Calmodulina dependente de proteína cinase II |
| 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 |
| GFAP | Proteína acídica fibrilar glial |
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante a insulina-1 |
| IBA-1 | Molécula adaptadora de ligação a cálcio ionizado-1 |
| JNK | Do inglês C-Jun N-terminal kinase |
| MAPKs | Proteínas quinases ativadas por mitógenos |
| mTOR | Do inglês mammalian target of rampamycin |
| NeuN | Proteína neuronal nuclear |
| NF-κB | Fator de transcrição κB |
| PARP | Do inglês poly ADP ribose polymerase |
| p38 MAPK | MAP quinases p38 |
| PI3K | Fosfatidilinositol-3-quinase |
| PLCγ | Fosfoinositideofosfolipase C-y |

# Sumário

*1. INTRODUÇÃO* ..... *11*

**1.1 Envelhecimento** ..... **11**

**1.2 Exercício e qualidade de vida no envelhecimento** ..... **12**

**1.3 Alterações cognitivas no envelhecimento** ..... **12**

**1.4 Exercício e neurogênese** ..... **15**

**1.5 BDNF e as vias de sinalização** ..... **18**

*1.5.1 Principais vias de sinalização do mBDNF* ..... 19

*1.5.2 Principais vias de sinalização do proBDNF* ..... 22

**1.6 Selênio e $(PhSe)_2$** ..... **25**

*2. OBJETIVOS* ..... *27*

***2.1. Objetivo Geral*** ..... **27**

**2.2. Objetivos Específicos** ..... **27**

*3. ARTIGO* ..... *29*

**3.1 ARTIGO 1:** ..... **30**

**DIPHENYL DISELENIDE-SUPPLEMENTED DIET AND SWIMMING EXERCISE ENHANCE NOVEL OBJECT RECOGNITION MEMORY IN OLD RATS** ..... **30**

Resumo ..... 31

Introdução ..... 31

Materiais e Métodos ..... 32

Resultados ..... 34

Discussão ..... 36

Referência Bibliográfica ..... 38

**3.2 MANUSCRITO 1:** ..... **41**

Resumo ..... 45

Introdução ..... 45

Materiais e Metodos ..... 46

Resultados ..... 49

Discussão ..... 51

Referência Bibliográfica ..... 53

Figuras e Legendas ..... 57

Figuras ..... 58

*4. DISCUSSÃO* ..... *64*

*5. CONCLUSÃO* ..... *71*

*6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS* ..... *72*

*ANEXO:* ..... *87*

# APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma breve revisão sobre os temas abordados nesta tese seguida pelo item **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

Com o aumento da expectativa de vida da população, o envelhecimento cerebral e a sua estreita associação com doenças neurodegenerativas como, por exemplo, as doenças de Alzheimer e Parkinson, têm sido alvo de intensas investigações nos últimos anos. A expectativa de vida em 1990 alcançava somente 67,7 anos de idade, hoje, em países desenvolvidos as pessoas vivem em média até os 77 anos de idade (DRISCOLL et al., 2008). O envelhecimento é um processo natural que pode ser acompanhado por uma perda progressiva das aptidões funcionais, morfológicas, bioquímicas, assim como modificações psicológicas. Diferentes fatores podem influenciar estes processos danosos, contribuindo para o surgimento de doenças (TEIXEIRA e GUARIENTO, 2010; ZAMBALDI et al., 2007). Assim como o desenvolvimento inicial, o processo de envelhecimento biológico está geneticamente programado e é inevitável, já que praticamente todos os sistemas do corpo decaem, tornando-se mais acelerados no envelhecimento (CLEMENTE, 2008). Com o avanço da idade ocorrem alterações e perdas em funções do organismo ditas normais, como, por exemplo: cardiovasculares, imunológicas, endócrinas, pulmonares, renais e neurofisiológicas; bem como nos diversos sistemas (ZIV e MELAMED, 2010). No sistema nervoso observa-se a diminuição do encéfalo em torno de 20% de seu peso, comparando um indivíduo de 20 anos a um idoso de 90 anos (MAZO et al., 2006), diminuição e/ou alteração das sinapses nervosas, diminuição das substâncias químicas associadas às atividades neurotransmissoras. Diferentemente das alterações normais, as doenças neurodegenerativas são caracterizadas por uma progressiva e lenta perda neuronal específica, levando a déficits neurológicos substanciais (ZIV e MELAMED, 2010). As perdas neuronais progressivas, no córtex frontal e no hipocampo, durante o envelhecimento, têm sido associadas aos prejuízos cognitivos (WHITWELL e JACK, 2005). Apesar do progresso científico neste campo, durante a última década, os mecanismos celulares e moleculares cerebrais responsáveis pelos prejuízos cognitivos associados ao envelhecimento, ainda não foram totalmente estabelecidos. Além das alterações morfológicas, alterações neuroquímicas também estão presentes ao longo do processo de envelhecimento, incluindo prejuízos no metabolismo da glicose (HOYER, 2004), alterações na função mitocondrial (YIN et al., 2014), aumento na geração de EROS e na diminuição da sinalização neuroendócrina (DICKSTEIN et al., 2013).

Estas mudanças fisiológicas são variadas e podem ou não se agravar, estando relacionadas com a qualidade de vida e saúde do idoso (MAZO et al., 2006).

### 1.2 Exercício e qualidade de vida no envelhecimento

A atividade física abrange a totalidade do ser, ultrapassando as melhorias aparentemente só motoras, associando-se aos desenvolvimentos cognitivos, volitivos e sociais (RAMOS, 2005). Com base em estudos, formou-se o consenso de que os exercícios estimulam a saúde em diversos aspectos e com isso ajudam para o alcance de uma melhor qualidade de vida (PELLEGRINOTTI, 200). A atividade física age como um fator de proteção para a incidência de demência em humanos (AARSLAND et al., 2010), atenuando o processo natural do envelhecimento, através da manutenção de um estado saudável, principalmente do cérebro, afastando fatores de risco comuns à terceira idade, promovendo uma melhor qualidade de vida (COTMAN e ENGESSER-CESAR, 2002; MEIRELLES, 1997). A saúde física e psicológica do idoso está diretamente relacionada com a sua qualidade de vida, ou seja, com a habilidade/capacidade de desempenhar atividades do dia-a-dia (TEIXEIRA e GUARIENTO, 2010). Diversos declínios funcionais decorrentes do aumento da idade são devidos ao estilo de vida adotado, que são extrínsecos ao envelhecimento e, portanto modificáveis. Desse modo, a adoção de um estilo de vida mais saudável, com o aumento das atividades físicas habituais ou até mesmo a inclusão de exercícios físicos na rotina dos idosos, poderão ser eficazes para um envelhecimento bem sucedido, minimizando as incapacidades associadas ao envelhecimento (BARROS NETO, 2007). Por outro lado, o baixo nível de atividades físicas habituais e a falta de exercícios físicos, na vida dos idosos, podem trazer vários problemas à saúde, dentre eles o declínio cognitivo.

### 1.3 Alterações cognitivas no envelhecimento

O envelhecimento fisiológico depende significativamente do estilo de vida adotado desde a infância ou a adolescência. Este é caracterizado por uma série de modificações nas funções orgânicas e mentais fazendo com que o organismo perca a capacidade de manter o equilíbrio e com que todas as funções fisiológicas comecem gradualmente a declinar (CANCELA, 2007). Com o envelhecimento, as alterações cognitivas se agravam, prejudicando principalmente a memória, que é uma das principais queixas dos idosos (PARENTE, 2006). A memória refere-se ao processo pelo qual o indivíduo codifica, armazena e recupera informações e conhecimentos. A codificação está relacionada com o processamento da informação enquanto

a consolidação envolve o processo de fortalecimento das representações já armazenadas. Para a memória ser útil, o indivíduo deve ser capaz de recuperar a informação quando esta for necessária (CASANOVA SOTOLONGO et al., 2004). Os tipos de memória podem ser classificados de acordo com o tempo que duram (imediata, de curta e longa duração) e de acordo com seu conteúdo (declarativas e procedurais) (IZQUIERDO, I., 2011; IZQUIERDO, I. e MCGAUGH, 2000).

Memória imediata é o tipo de memória que se mantém durante alguns segundos, no máximo alguns minutos, a informação que está sendo processada no momento; sua capacidade é limitada e as informações são mantidas por processos de atenção e ensaio. Esta espécie de memória diferencia-se das demais por não deixar traços e não produzir arquivos (IZQUIERDO, I., 2002).

A memória de curta duração é um tipo de memória que retêm a informação temporariamente (dura minutos ou horas) até que seja esquecida (muito sensível a alterações) ou se incorpore em um armazenamento de longa duração, mais estável e permanente.

Já a memória de longa duração é auto mantida, estável e ilimitada em sua capacidade (dura dias, semanas ou anos), podendo reter milhares de fatos, conceitos e padrões, algumas vezes por toda a vida, garantindo o registro do passado autobiográfico e dos conhecimentos do indivíduo (BAXTER e BAXTER, 2001; ULLMAN, 2004). A memória de longa duração é subdividida de acordo com o seu conteúdo em declarativa ou explícita, procedural ou implícita.

Memória declarativa ou explícita que é a lembrança consciente de fatos e acontecimentos, memórias adquiridas com plena intervenção da consciência. São processadas as memórias para eventos, fatos, palavras, faces, músicas, todos os conhecimentos que adquirimos durante uma vida de experiências e aprendizados, que podem potencialmente ser declarados, trazidos à mente de uma forma verbal ou como uma imagem mental (IZQUIERDO, I., 2002; SQUIRE, R. L. e KANDEL, 2003). Este sistema está subdividido em memória episódica e memória semântica (EICHENBAUM, 1997; IZQUIERDO, I., 2002; SQUIRE, R. L. e KANDEL, 2003). Memória episódica reúne as memórias autobiográficas (experiências, emoções e acontecimentos específicos), referentes a eventos aos quais assistimos ou participamos (IZQUIERDO, I., 2002; SQUIRE, R. L. e KANDEL, 2003). Memória semântica reúne as memórias para fatos, se referindo à capacidade de evocar fatos, conceitos, significados e conhecimentos gerais acerca do mundo (IZQUIERDO, I., 2002; SAUMIER e CHERTKOW, 2002; SQUIRE, R. L. e KANDEL, 2003).

Memória procedural ou implícita são adquiridas gradualmente ao longo de diversas experiências, e está relacionada com a capacidade ou habilidade motora e sensorial (hábitos), como por exemplo, andar de bicicleta, nadar, correr (IZQUIERDO, I., 2011; SQUIRE, R. L. e KANDEL, 2003).

A formação da memória envolve uma série de etapas, começando pela aquisição ou registro de um acontecimento, de um pensamento, de uma emoção nos sistemas neurais ligados a memória (SQUIRE, R. L. e KANDEL, 2003), continuando por uma segunda etapa que consiste na codificação destes acontecimentos, comparando ou selecionando através das semelhanças e diferenças, entre as memórias recentes e antigas para serem armazenadas (GUYTON e HALL, 1997; SQUIRE, R. L. e KANDEL, 2003), seguindo para a etapa de consolidação (armazenamento), que é a manutenção do conhecimento, fase onde a memória pode ser reforçada pela repetição ou associação com outros dados e onde ficam disponíveis para serem lembrados (GUYTON e HALL, 1997). A evocação ou recordação é a última etapa, consiste num processo que permite a localização ou acesso a uma memória armazenada para utilizá-la mentalmente ou através do comportamento (IZQUIERDO, I., 2002).

O hipocampo, uma estrutura cerebral envolvida com a memória e a regulação do estresse (KIM, J. J. e DIAMOND, 2002; SMALL et al., 2011), é um dos primeiros alvos do sistema nervoso central (SNC) passível aos danos relacionados ao envelhecimento (JACOBSON et al., 2008; ROSENZWEIG e BARNES, 2003), e é a estrutura parcialmente responsável pelo declínio da memória (DRISCOLL e SUTHERLAND, 2005).

Esta estrutura foi primeiramente identificada por Giulio Cesare Aranzi, é uma das mais antigas áreas cerebrais e está localizada na região temporal medial do cérebro (GROSS, 2000). O seu papel nos processos de aprendizado e memória vem sendo elucidado ao longo dos anos. Inicialmente, alguns autores observaram uma perda de memória em roedores e humanos, após lesão limitada ao hipocampo, evidenciada quando os mesmos foram submetidos a tarefas que exigissem aptidões de memória e aprendizado (EICHENBAUM et al., 1989; OLTON e PAPAS, 1979; SCOVILLE e MILNER, 1957). Além disso, mais recentemente, Panegyres e Raine demonstram que o hipocampo é uma estrutura crucial para o armazenamento e a recuperação de certos tipos de informações, além de ser uma estrutura chave em processos relacionados à fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (PANEGYRES, 2004; RAINE, 2006). Evidências apontam que esta estrutura também desempenha um papel fundamental na capacidade de recordar fatos e eventos cotidianos (KROES e FERNANDEZ, 2012). Em concordância com experimentos realizados em animais, estudos em humanos, que apresentavam danos na memória já diagnosticados,

permitiram, através de técnicas de ressonância magnética, a observação de anormalidade hipocampal, esta estrutura mostrou-se diminuída e atrofiada (SQUIRE, L. R. et al., 1990). Devido a sua importante funcionalidade, pelo fato de ser uma região altamente reativa a uma variedade de tratamentos e ser uma das estruturas mais relacionadas com alterações eletrofisiológicas, estruturais e morfológicas durante o envelhecimento, o hipocampo tem recebido crescente interesse de pesquisadores (CERBAI et al., 2012).

Neste contexto, estudos experimentais com animais têm demonstrado que o exercício previne a apoptose hipocampal, facilitando a recuperação de danos ao SNC causados pelo envelhecimento, melhorando a memória e o aprendizado (LEE, H. H. et al., 2006; PIETRELLI et al., 2012; VAN PRAAG, 2009). O exercício aeróbico é uma das principais intervenções comportamentais que pode influenciar no aumento das neurotrofinas, da neuroplasticidade, na sinaptogênese e na melhora da função cognitiva em animais velhos e em humanos idosos (ANGEVAREN et al., 2008; HOTTING e RODER, 2013; SMITH et al., 2010)

### 1.4 Exercício e neurogênese

A neurogênese é um processo que consiste em quatro estágios: 1- proliferação celular, que é regulada por uma variedade de estímulos, como o exercício físico e as moléculas sinalizadoras, que são expressas ou secretadas por componentes celulares dos nichos neurogênicos (MING e SONG, 2005; ZHAO et al., 2008); 2 -migração celular, que acontece através do fluxo migratório rostral até o bulbo olfatório, onde se estabelecem em camadas neuronais distintas, através da migração radial (SAWAMOTO et al., 2006); 3 - diferenciação neuronal, que é a evolução da glia para células-tronco neurais e; 4 - integração, controlada por neurotransmissores e pela atividade neural (SUH et al., 2009). Após a diferenciação terminal, os novos neurônios pós-mitóticos sobrevivem e tornam-se células granulares e, somente após estes estágios, os neurônios são incorporados ao cérebro maduro (VAN PRAAG et al., 1999a).

O exercício físico tem sido associado 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 a uma rede neural e tornarem-se funcionais (LLEDO et al., 2006). Do ponto de vista molecular, os mecanismos pelos quais o exercício induz a angiogênese, neurogênese, e sinaptogênese têm recebido crescente atenção nos últimos anos.

Atualmente, já está bem definido que o hipocampo é uma região cerebral onde existe neurogênese também na fase adulta. Nessa região, a neurogênese resulta na formação de novas células, principalmente, no giro denteado em que as células granulares estendem seus dendritos e axônios para formar novas conexões. As novas células se integram com as demais células e apresentam sensibilidade a estímulos internos e externos como as outras células pré-existentes (AMREIN et al., 2011). Existem diferenças eletrofisiológicas e morfológicas dos neurônios gerados na juventude e na idade adulta. Os neurônios gerados tardiamente podem ser transitórios e morrer pouco tempo depois, podendo apresentar elementos funcionais distintos. Sendo assim, muitas vezes essas células são geradas, cumprem seu papel e depois morrem (MONGIAT e SCHINDER, 2011). Animais velhos têm menos células progenitoras, menos diferenciação neuronal, e seus "novos neurônios" vivem menos do que nos animais jovens. O declínio na neurogênese, relacionado ao envelhecimento já está bem documentado, entretanto a causa desse fenômeno é pouco entendida e precisa ser mais investigada (LEE, S. W. et al., 2012). Uma possível explicação para esse fenômeno seria em relação ao microambiente em que as células progenitoras se encontram. A neurogênese é altamente regulada pelo nicho celular, que pode ser modificado durante o envelhecimento. Ahlenius e colaboradores mostraram que as células progenitoras retiradas de animais velhos, são capazes de gerar novos neurônios funcionais *in vitro (AHLENIUS et al., 2009)*. As sinapses no hipocampo ocorrem primeiramente nas células granulares do GD e seguem através das fibras para as células piramidais da sub-região CA3 e finalmente para a sub-região CA1, que está interligada ao córtex. Sub-regiões do hipocampo possuem diferentes funções nos processos de aprendizado e memória (PAXINOS, 2004).

Além disso, processos inflamatórios e estresse oxidativo são dois potentes inibidores da neurogênese, e ambos também estão aumentados no hipocampo dos animais velhos (LEE, S. W. et al., 2012). Os astrócitos, células gliais que representam aproximadamente 50% do número total de células do SNC, têm a maior diversidade funcional do cérebro, além de uma capacidade dinâmica de alterar seu fenótipo no decorrer da vida (SHAO e MCCARTHY, 1994). Inicialmente, acreditava-se que os astrócitos eram meros auxiliares da atividade neuronal (KETTENMANN e VERKHRATSKY, 2008), porém, ao longo dos anos tornou-se claro que essas versáteis células gliais são responsáveis por uma variedade de funções complexas e essenciais ao SNC (MARAGAKIS e ROTHSTEIN, 2006; NEDERGAARD et al., 2003; WANG, D. D. e BORDEY, 2008). Evidências consistentes demonstraram ainda que a interação neurônio-glia é essencial para a plasticidade sináptica (CLARKE e BARRES, 2013; ULLIAN et al., 2001), com o astrócito sendo primordial na liberação e regulação de

moléculas de sinalização (ALLEN e BARRES, 2005; FIELDS e STEVENS-GRAHAM, 2002), responsável por regular a formação de sinapses e também modular a sua atividade, podendo exercer um papel essencial na memória e na aprendizagem (OTA et al., 2013).

Os astrócitos ainda desempenham um papel fundamental na formação e manutenção da barreira sangue-cérebro (BSC) e consequentemente, na modulação da resposta imune inflamatória, regulam o movimento de eletrólitos, de xenobióticos e também a passagem de células do sistema imune entre a circulação sistêmica e o parênquima do SNC, a fim de manter um ambiente adequado para a função neuronal através da manutenção do pH e homeostase iônica no SNC (CABEZAS et al., 2014; ZHANG e PARDRIDGE, 2001). Os astrócitos tamponam as concentrações extracelulares de potássio que se acumulam com a atividade neural, pois eles expressam canais de potássio nas sinapses e nos processos terminais ao redor dos capilares (WANG, D. D. e BORDEY, 2008).

As inter-relações entre as células neurais e gliais contribuem para o desenvolvimento, função e capacidade de reparação do cérebro e podem participar de sua deterioração devido ao envelhecimento ou doença (SOFRONIEW e VINTERS, 2010; TARDY, 2002). No SNC, os astrócitos e microglia são as duas populações de células capazes de responder às injúrias as células neurais. Isto pode alterar a morfologia, a expressão de fatores neurotrófico e/ou neurotóxicos ou afetar a associação entre estes dois fenômenos (STREIT et al., 1999). Astrócitos e microglia respondem a todas as formas de danos neurológicos, essas células sofrem ativação em um fenômeno conhecido como gliose. Astrogliose está associada com o fenótipo alterado entre a regulação positiva de um grande número de moléculas (COOKSON e PENTREATH, 1994; COSTA et al., 2002; EDDLESTON e MUCKE, 1993; LEFRANCOIS et al., 1997; MEAD e PENTREATH, 1998; TARDY, 2002) incluindo o acúmulo de filamentos intermediários (FI) que contêm a proteína GFAP. O citoplasma das células animais é composto por proteínas de microfilamentos (actina), de microtúbulos (tubulina) e de FI. As proteínas de FI são diferentemente expressas de acordo o tipo e grau de diferenciação do tecido às quais se encontram, sugerindo a existência de funções específicas para cada uma delas. As duas principais proteínas de FI de astrócitos são a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e vimentina (BRAMANTI et al., 2010; PEKNY, 2001).

Uma das características principais da astrogliose é um aumento da expressão de GFAP, mas também pode ser associada com a neurodegeneração (COSTA et al., 2002; COYLE e SCHWARCZ, 2000; TARDY, 2002), podendo refletir na sinaptogênese e na neurotransmissão anormal (MOISES et al., 2002; O'CALLAGHAN e JENSEN, 1992; RAJKOWSKA et al., 2002). Estas células gliais também liberam fatores tróficos, tais como

GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) e BDNF (brain-derived neurotrophic factor) que são capazes de controlar o desenvolvimento, sobrevivência, diferenciação e plasticidade das funções cerebrais ao longo da vida (PATTERSON, 2015; TAPIA-ARANCIBIA et al., 2008).

O exercício estimula o cérebro por diferentes mecanismos moleculares, estudos demonstraram que um dos principais mecanismos é através do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (COELHO et al., 2013; LIU et al., 2009), que desempenha um papel crucial na neuroplasticidade e neuroproteção.

### 1.5 BDNF e as vias de sinalização

O BDNF é uma proteína endógena da família das neurotrofinas, fatores de crescimento do sistema nervoso, que incluem ainda o fator de crescimento nervoso, a neurotrofina 3, neurotrofina 4/5 e a neurotrofina *6* (POO, 2001). Ele foi descoberto em 1982 por Yves Barde e Hans Thoenen, através de sua purificação no cérebro de um porco (BARDE et al., 1982). O BDNF é o fator de crescimento mais amplamente distribuído no SNC, sendo encontrado em grandes concentrações em regiões como o hipocampo, o hipotálamo, o córtex e o cerebelo de humanos (MURER et al., 2001). O BDNF tem um papel essencial na regulação da plasticidade neuronal, mais especificamente na sobrevivência, diferenciação e crescimento de neuritos (HUANG e REICHARDT, 2001). Além disso, está envolvido em outras funções do cérebro ligadas à memória e ao aprendizado (TYLER et al., 2002). Evidências comprovam que uma alteração na sinalização do BDNF afeta a memória de longo prazo, e o exercício é importante para manter esta sinalização, preservando as mudanças estruturais e as sinapses no hipocampo (LU et al., 2008). O aumento na sinalização do BDNF no hipocampo intensifica a neurogênese e as funções eletrofisiológicas, tendo um papel chave no desenvolvimento, suporte trófico e na plasticidade neuronal de mamíferos (HELDT et al., 2007). Bem como outras neurotrofinas, o BDNF é inicialmente sintetizado na forma de um precursor chamado pro-BDNF, que posteriormente será clivado pela ação da enzima plasmina, dando origem ao BDNF maduro (mBDNF) (YANG et al., 2009). O ativador do plasminogênio tecidual (t-PA) é amplamente distribuído no SNC, incluindo o hipocampo e sua ação é fundamental no processamento de BDNF (SALLE; STRICKLAND, 2002). Sua ação enzimática é efetiva em converter o precursor inativo plasminogênio em plasmina, que por sua vez tem o papel de clivar pro-BDNF a mBDNF (PLOW et al., 1994). O t-PA tem se mostrado crucial para a plasticidade sináptica no hipocampo e sua liberação ocorre através dos terminais axonais estimulados pela atividade neuronal (PANG, 2014). Ding et al. avaliaram os efeitos de um

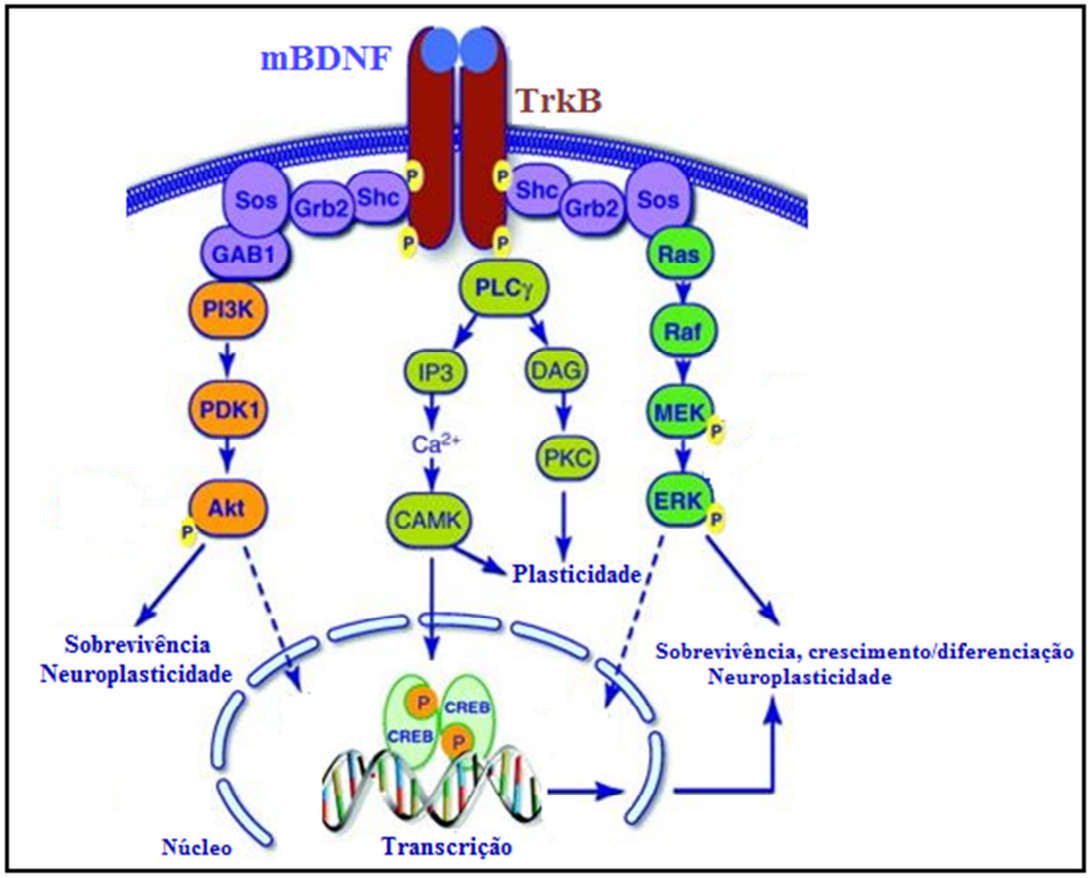
inibidor da atividade hipocampal de t-PA no processamento de BDNF em ratos expostos ao exercício voluntário. Os resultados indicam que a ativação de t-PA parece um importante passo para a regulação de BDNF durante o exercício. O exercício físico elevou a atividade enzimática de t-PA em proporção com a distância percorrida pelos animais e foi capaz de modular de maneira homeostática os níveis de pro-BDNF e mBDNF. Além disso, o bloqueio de t-PA neutralizou os efeitos do exercício em sistemas ativados em cascata pela ação do BDNF na plasticidade sináptica, como sinapsina I e CaMKII. Esses resultados parecem representar um mecanismo pelo qual o exercício pode afetar a plasticidade sináptica, agindo juntamente com o t-PA (DING; YING; GÓMEZ-PINILLA, 2011).

O pro-BDNF e o mBDNF influenciam a função neuronal, ligando a receptores distintos e ativando distintas vias de sinalização. O mBDNF se liga com alta afinidade ao receptor tirosina cinase B (TrkB), enquanto o pro-BDNF se liga ao receptor pan-neurotrofina 75 ($p75^{NTR}$). Isso faz com que essas diferentes formas exerçam ações antagônicas, tanto na morfologia quanto na fisiologia neuronais. O crescimento de dendritos, a sobrevivência celular e a potenciação de longa duração (LTP) são promovidos pelo mBDNF, enquanto o pro-BDNF induz a retração dos dendritos, a depressão de longa duração (LTD) e a apoptose (AREVALO e WU, 2006; POO, 2001; REICHARDT, 2006). Os déficits de memória em roedores velhos são correlacionados com a integridade da ativação dos receptores de TrkB. (KRAMER et al., 2006; VON BOHLEN e HALBACH, 2010). A ativação destes receptores modula a plasticidade sináptica, a diferenciação e a sobrevivência neuronal sendo essenciais para a formação da memória e o aprendizado (OHIRA e HAYASHI, 2009; SAKAMOTO et al., 2011).

### *1.5.1 Principais vias de sinalização do mBDNF*

Na figura 1 estão ilustradas as vias de sinalização ativadas por mBDNF/TrkB. A ligação de alta afinidade entre mBDNF e Trkb ativa principalmente três vias de sinalização: fosfolipase Cγ (PLCγ), fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) e cinase regulada por sinal extracelular (ERK). Separadamente, essas vias de sinalização ativam cascatas de reações distintas, mas que resultam na fosforilação e ativação do fator de transcrição da proteína ligante ao elemento responsivo de AMP cíclico (CREB), que medeia à transcrição de genes essenciais para a sobrevivência e diferenciação de neurônios.

Figura 1. Receptor do mBDNF e suas vias de sinalização.




Fonte: Adaptado de(CUNHA et al., 2010).

A expressão de BDNF é positivamente regulada por glutamato, um aminoácido cujo receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) induz a LTP e causa uma rápida polimerização de actina na espinha dendrítica no hipocampo, quando estimulado (AICARDI et al., 2004). Um estudo recente mostrou que bloquear a ação do BDNF resulta em uma significativa redução na densidade da espinha dendrítica, associada ao aumento do seu tamanho e diminuição no comprimento da cabeça. Essas mudanças estão associadas com a diminuição nos níveis de actina dentro das cabeças da espinha (KELLNER et al., 2014). Mais ainda, nos neurônios do hipocampo o AMP cíclico modula positivamente a fosforilação de TrkB induzida por BDNF e a formação de espinhas dendríticas, regulando a sinalização e o tráfego de TrkB (JI et al., 2005). Essas evidências mostram que o BDNF tem um papel importante na plasticidade de regiões do SNC, em especial no hipocampo. Essa propriedade depende de mudanças funcionais e morfológicas, como a fosforilação de proteínas e a reorganização do citoesqueleto de espinhas dendríticas. Visto que o RNA mensageiro para o BDNF e seu receptor, TrkB, estão localizados nas espinhas dendríticas e que essas têm sua densidade significativamente reduzida com a idade, parece haver uma relação entre a expressão de RNA mensageiro para o BDNF e o TrkB e prejuízos nas conexões sinápticas com o envelhecimento (HOF e MORRISON, 2004). Visando comparar as respostas na expressão gênica de BDNF

entre o exercício forçado e o exercício voluntário, Alomari et al. dividiram ratos em dois grupos distintos e os submeteram a natação forçada ou exercício voluntário em esteira. Ambos os grupos tiveram um aumento nos níveis de BDNF no hipocampo, além de uma melhora no aprendizado. Os autores concluíram que, embora o exercício forçado esteja associado com altos níveis de estresse, houve uma melhora na memória e no aprendizado e aumentou a expressão de BDNF após o treinamento, mas que, no protocolo em que os animais foram submetidos ao exercício voluntário, a expressão de BDNF no hipocampo destes ratos foi significativamente maior (ALOMARI et al., 2013).

O exercício aumenta a expressão gênica de muitos componentes da cascata das MAPKs, sendo esta via a maior cascata sinalizadora dos receptores Trk, que é afetada com o envelhecimento (RAGE et al., 2007; SEGAL e GREENBERG, 1996). As MAPKs estão envolvidas na plasticidade sináptica, na formação de memória e na integração de múltiplos sinais extracelulares (SELCHER et al., 2001; SWEATT, 2001). As vias da MAPK coordenam muitos eventos sinápticos em conjunção com as vias CaMK. Por exemplo, a sinapsina I é fosforilada pelos sistemas MAPK e CaMKII (MATSUBARA et al., 1996). A CaMKII afeta o $Ca^{+2}$ pós-sináptico importante para a função sináptica (SODERLING, 2000), e está envolvido na formação de memória hipocampo-dependente (FUKUNAGA e MIYAMOTO, 2000). Um estudo demostrou um aumento na expressão de PKC após 7 dias de exercício (MOLTENI et al., 2002). A PKC é necessária para a ativação da cascata MAPK e para o crescimento de nervos (CORBIT et al., 1999). Tem sido demonstrado também que membros da família CaMK aumentaram sua atividade após curtos períodos de exercício, enquanto membros da via MAPK aumentaram sua atividade conforme o tempo de exercício, principalmente após 7 dias (MOLTENI et al., 2002). A cascata da PI3K – Akt promove a ativação e inibição de proteínas como mTOR, GSK3-β e FOXO estando relacionada com processos chaves para o SNC como: transcrição proteica, apoptose, autofagia e estresse oxidativo. O controle fino das proteínas da cascata PI3K – Akt promove a sobrevivência neuronal (FERNANDEZ e TORRES-ALEMAN, 2012; VAN DER HEIDE et al., 2006).

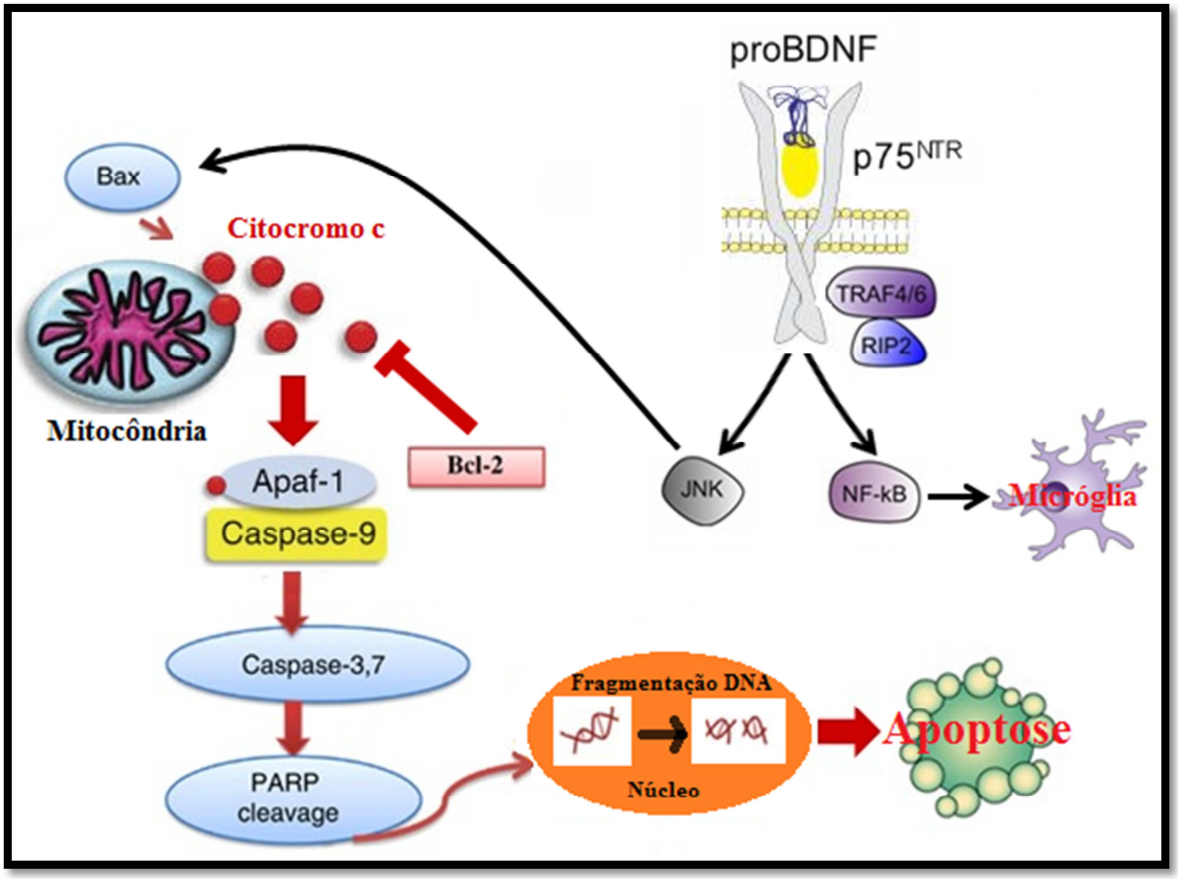
A ERK é um membro da família de MAPKs sendo sua atividade necessária para o estabelecimento da LTP no hipocampo (ENGLISH e SWEATT, 1997), participando na formação das memórias espaciais (BLUM et al., 1999). Nos neurônios, a ERK é ativada em resposta à liberação do neurotransmissor glutamato (FIORE et al., 1993), em um mecanismo dependente da elevação intracelular de cálcio (mediado pelo receptor do tipo NMDA ou pelos canais de cálcio voltagem-dependentes)(WALKER et al., 2003). Sua ativação provoca, então, mudanças na atividade e quantidade de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA nas

sinapses (ZHU et al., 2002), bem como modificações estruturais na morfologia das espinhas dendríticas (WU et al., 2001). Estes dois mecanismos seriam a ligação entre a ativação da ERK e as alterações fisiológicas que correspondem à formação da LTM (memória de longa duração)(THOMAS e HUGANIR, 2004). A ERK é necessária para o controle da expressão gênica, e esta é, provavelmente, uma função essencial desta via de sinalização na regulação dos processos de plasticidade sináptica e memória. Algumas formas de potenciação que são bloqueadas por inibidores da ERK não ocorrem quando não há translocação da quinase para o núcleo (PATTERSON et al., 2001).

### *1.5.2 Principais vias de sinalização do proBDNF*

Na figura 2 estão ilustradas as vias de sinalização ativadas por proBDNF/p75$^{NTR}$. O proBDNF se liga ao receptor p75$^{NTR}$ com baixa afinidade e leva à apoptose e a ativação da micróglia, através da cascata de reações ativada por c-Jun N-terminal cinase (JNK) ou pelo fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB).

Figura 2. Receptor do proBDNF e suas vias de sinalização.




Fonte: Adaptado de (CUNHA et al., 2010).

A literatura relata que algumas características bioquímicas de tecidos velhos são causadas por um aumento do estado pró-oxidante e isto afeta a função de proteínas chaves que regulam genes de resposta ao estresse como $P38^{MAPK}$ e JNK. Assim, a atividade ou função dos componentes das vias de sinalização e fatores de transcrição específicos que regulam os genes de resposta ao estresse são alvos potenciais de EROs, resultando em um nível aumentado da atividade basal da via de sinalização de estresse, fatores de transcrição e genes de resposta ao estresse (CARUSO et al., 2004). No envelhecimento celular, o excesso de radicais livres e EROs, ERN podem induzir a falência mitocondrial e ocasionar um aumento da apoptose neuronal (MERAD-BOUDIA et al., 1998). O estresse oxidativo também causa abertura dos canais iônicos na membrana da mitocôndria, conhecidos como poros de transição, liberação da proteína citocromo c, que provoca a ativação de diversas enzimas executoras da morte celular apoptótica, culminando na apoptose (FERRARI, C. K. B., 2000). Neste sentido, sabe-se que o citocromo c liberado forma um complexo com a proteína ativadora da apoptose (Apaf-1) que cliva as caspases, enzimas ricas em cisteína que clivam o ácido aspártico e outros aminoácidos, ativando-as para a degradação do DNA causando um desequilíbrio iônico e a morte celular por apoptose, tal desequilíbrio pode envolver a via mitocondrial intrínseca ou estímulos extrínsecos à célula (BROUNS e DE DEYN, 2009; DOYLE et al., 2008; FERRARI, C.K.B., 2000b). A via intrínseca independe de sinalizações de receptores de membrana celular. No citosol, a citocromo c reage com Apaf-1 para ativar a caspase-9, a qual aciona a caspase-3 que degrada o citoesqueleto celular e ativa endonucleases que danificam o DNA nuclear e levam a célula invariavelmente à morte (DOYLE et al., 2008; SUGAWARA et al., 2004; VILA e PRZEDBORSKI, 2003). No caso da via extrínseca, esta pode ser mediada por caspase efetora independentemente da presença de citocromo c no citoplasma. Esta via depende de membros das famílias Fas/CD-95 e TNF-R1, e seus respectivos ligantes de morte FAS (FasL) e TNF-alfa, uma vez, estabelecida a ligação entre receptores e ligantes, uma proteína adaptadora intracelular é acionada e ativa a caspase-8, a qual pode ativar a caspase-3 efetora que aciona a poli(ADP-ribose)polimerase (PARP), que em excesso leva à depleção de NADP e ATP que, respectivamente, causam dano ao DNA e aumento da falência energética. Também pode haver a ativação da enzima desoxirribose nuclease ativada por caspase que pode danificar o DNA nuclear. A caspase-8 também pode provocar o truncamento da proteína Bid citoplasmática, um membro da família Bcl pró-apoptótica, que em conjunto com Bax e Bak, formam poros na membrana mitocondrial com vazamento de citocromo c, o que leva à morte celular mediada por caspase-3 (DOYLE et al., 2008; SUGAWARA et al., 2004; VILA e PRZEDBORSKI, 2003).

O bloqueio da liberação do citocromo c, desempenhado pela proteína Bcl-2, da superfície externa da membrana mitocondrial, inibe a apoptose, e diminui a formação do ânion superóxido ($O^{\cdot}_2$-) aumentando a sobrevivência celular, inclusive de neurônios (KANE et al., 1993; SOANE e FISKUM, 2005).

Os processos de apoptose e neurogênese têm sido elementos chaves no estudo do envelhecimento e de doenças neurodegenerativas. A regulação da morte celular é determinante na longevidade do sistema nervoso adulto, e o papel da apoptose tem sido considerado decisivo para o entendimento das doenças degenerativas, em estudos pós mortem e em modelos animais (ZIV e MELAMED, 2010). A proteína *polyADPribose polymerase* (PARP) atua no reparo do DNA, mas também participa da cascata de sinalização de apoptose, uma vez que interage com fatores de transcrição chaves na regulação da morte/sobrevivência celular e da inflamação(SONGIN et al., 2007).

O encéfalo é particularmente susceptível aos efeitos prejudiciais das EROs, devido à sua alta taxa metabólica e da redução tanto das defesas antioxidantes quanto dos mecanismos de reparo durante o envelhecimento (ANDERSEN et al., 2004). Além disso, as EROs estão envolvidas na regulação redox das células do sistema imune como por exemplo, as células da microglia que são ativadas sob condições oxidativas (HALLIWELL, 2007). Essa ativação pode ser mediada pelo sistema da NADPH oxidase resultando em um aumento no consumo de oxigênio e consequente produção do radical ânion superóxido. Este radical pode formar peroxinitrito (ONOO-), que pode depletar os grupamentos tióis e com isso alterar o balanço redox da glutationa. Este desequilíbrio pode induzir a fosforilação do inibidor kappa-B (IκB) promovendo a ativação do NF-κB através da sua translocação para o núcleo. A ativação do NF-κB leva à transcrição de mediadores inflamatórios, como TNF-α, IL-1β, entre outros (OKTYABRSKY e SMIRNOVA, 2007).

Embora tenha sido sugerido que o sistema imune possa exercer efeitos benéficos sobre as funções cognitivas, sua ativação crônica pode levar a alterações patológicas. Estas alterações podem perturbar o equilíbrio necessário para manutenção das funções encefálicas, levando a prejuízos sobre plasticidade, neurogênese, aprendizado e memória. Estas condições podem ocorrer tanto em situações fisiológicas como durante o envelhecimento (CECHETTI et al., 2012; JURGENS e JOHNSON, 2012; YIRMIYA e GOSHEN, 2011).

Estudos experimentais têm sugerido que as modificações do microambiente do encéfalo senescente estão associadas ao estresse oxidativo, aumento da reatividade microglial e inflamação crônica (JURGENS e JOHNSON, 2012; SIQUEIRA et al., 2005).

Alterações do sistema imune podem induzir um estado pró-inflamatório no microambiente encefálico senil e desta forma participar no processo do declínio cognitivo relacionado ao envelhecimento (BUCHANAN et al., 2008; LYNCH, A. M. et al., 2010). Células da microglia com um fenótipo reativo são normalmente referidas como "sensibilizadas" e apresentam alterações como desramificação e aumento do citoplasma. Neste estado, estas células promovem uma maior liberação de citocinas inflamatórias em comparação com a microglia ramificada, em "repouso", denominada de vigilante. Embora a microglia "sensibilizada" tenha sido associada com doenças crônico-degenerativas, evidências indicam que este fenótipo também está presente no encéfalo durante o envelhecimento normal (BILBO, 2010). A reatividade microglial associada ao envelhecimento pode contribuir para o dano neuronal assim como para a perda de mecanismos neuroprotetores e neurorregulatórios, podendo resultar em redução das funções cognitivas (BARRIENTOS et al., 2010; JURGENS e JOHNSON, 2012).

### 1.6 Selênio e $(PhSe)_2$

O Selênio (Se) é um componente fundamental para a sobrevivência celular de uma variedade de organismos. Ele é encontrado em um número limitado de moléculas e interage apenas com poucos grupos de biomoléculas funcionais ou com peróxidos pró-oxidantes fortes (ARNER, 2009). No geral, os níveis de Se são geralmente considerados como um fator importante para manter a saúde em idosos (GONZALEZ et al., 2006; 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 a saúde, cabe ressaltar que os limites entre níveis essenciais e tóxicos deste nutriente são bastante próximos. Dentre as fontes dietéticas de Se estão à castanha-do-pará, o alho, a cebola, o brócolis, os cogumelos, cereais, pescados, ovos e as carnes (DUMONT et al., 2006). A ingestão diária recomendada pela ANVISA é de aproximadamente 34 microgramas.

Em mamíferos, o Se pode se 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 selenioproteínas, tais como a glutationa peroxidase (GPx), selenoproteína P (SepP) e tiorredoxina redutase (TrxR) (KRYUKOV et al., 2003). Estas selenoproteínas, ao participar na redução de peróxido de hidrogênio e lipoperóxidos, regulam o estresse oxidativo (Pappet al., 2007). O Se estimula a formação de anticorpos, a

atividade de células T helper e células NK (MEHDIET et al., 2013). Estudos "*in vitro* " e "*in vivo*" em animais mostraram que a glutationa 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). Em relação a função biológica do Se, sabe-se que este elemento desempenha um papel chave em diversas vias metabólicas, incluindo o metabolismo de hormônios tireoidianos, crescimento celular e sistema de defesa antioxidante (BROWN e ARTHUR, 2001; DUNTAS e BENVENGA, 2014; STAZI e TRINTI, 2008). Na década de 30, o Se foi reconhecido como uma substância tóxica devido a casos de envenenamento na pecuária em solos ricos neste elemento (NOGUEIRA e ROCHA, 2011). Entretanto, em 1957 Schwartz e Foltz encontraram evidências de que o Se era um elemento traço essencial na dieta animal (SCHWARZ e FOLTZ, 1999). Assim, a história biológica do Se foi marcada por um contraste entre seus efeitos benéficos e tóxicos (NOGUEIRA e ROCHA, 2011).

Desta forma, diversos estudos do nosso grupo, tem se concentrado no desenvolvimento de compostos orgânicos de Se estáveis, com o intuito de investigar seus efeitos bioquímicos e farmacológicos além de diminuir sua toxicidade. Um fato interessante é que, em geral, os compostos orgânicos de Se tem uma maior biodisponibilidade e possuem menos efeitos tóxicos que suas formas inorgânicas e que possuam um potencial terapêutico para tratar doenças (NARAJJI et al., 2007).

O disseleneto de difenila [$(PhSe)_2$] **(Figura 3)** destaca-se por apresentar diversas atividades terapêuticas, podendo-se citar neuroprotetora (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), anti-inflamatória e antinociceptiva (NOGUEIRA et al., 2003), antioxidante (LUCHESE et al., 2009; MEOTTI et al., 2004), hepatoprotetora (BORGES et al., 2005; WILHELM et al., 2009), antiúlcera (SAVEGNAGO et al., 2006), quimiopreventiva (DE VARGAS BARBOSA et al., 2008; MELO et al., 2013), antidepressiva e ansiolítica (SAVEGNAGO et al., 2008), além de melhorar o desempenho cognitivo de roedores (CECHELLA et al., 2014; LEITE et al., 2014; ROSA et al., 2003; SOUZA et al., 2010; STANGHERLIN et al., 2008).

Além destes efeitos, 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 ao estado redox, tais como o NFκB e MAPKs.

Figura 3. Estrutura química do $(PhSe)_2$.

Fonte: Palmier C, 1986.

Portanto, este estudo pretende contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que associem exercício físico com compostos orgânicos de selênio, como o $(PhSe)_2$, para a melhora da memória de ratos velhos, bem como esclarecer o seu mecanismo de ação.

# 2. OBJETIVOS

## *2.1. Objetivo Geral*

O objetivo geral desta tese foi avaliar os efeitos do disseleneto de difenila $(PhSe)_2$ e do exercício físico de natação, sobre o declínio da memória e nas alterações bioquímicas no SNC causadas pelo envelhecimento em ratosWistar de 27 meses de idade.

## 2.2. Objetivos Específicos

Considerando os aspectos mencionados, os objetivos específicos desta tese compreendem:

- Investigar se a suplementação com o $(PhSe)_2$ e o exercício físico de natação pode prevenir do declínio na memória de curta e longa duração e a memória espacial relacionada à idade;

- Estudar o efeito do $(PhSe)_2$ e o exercício físico de natação na expressão de proteínas neurotróficas responsáveis por modular a memória e a transmissão sináptica;

- Avaliar o papel neuroprotetor do $(PhSe)_2$ e do exercício físico de natação na neurodegeneração em hipocampo ratos velhos;

- Verificar o efeito do exercício físico sobre a ativacao de microglia marcada com Iba-1 (do inglês, ionized calcium-binding adaptor molecule-1, marcador de células da microglia) em hipocampo de ratos velhos;

- Investigar o efeito do exercício físico sobre a ativação de astrócitos marcados com GFAP (marcador de astrócitos maduros) em hipocampo de ratos velhos;

# 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 nos próprios artigo e manuscrito. O artigo e o manuscrito estão dispostos da mesma forma em que foram publicados ou organizados para a submissão.

3.1 ARTIGO 1:

**DIPHENYL DISELENIDE-SUPPLEMENTED DIET AND SWIMMING EXERCISE ENHANCE NOVEL OBJECT RECOGNITION MEMORY IN OLD RATS**

José L. Cechella,Marlon R. Leite, Alisson R. Rosario, Tuane B. Sampaio, Gilson Zeni

AGE, v. 36, p. 9666, 2014
DOI 10.1007/s11357-014-9666-8

AGE (2014) 36:9666
DOI 10.1007/s11357-014-9666-8

# Diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise enhance novel object recognition memory in old rats

**José L. Cechella · Marlon R. Leite · Alisson R. Rosario · Tuane B. Sampaio · Gilson Zeni**

Received: 27 January 2014 / Accepted: 18 June 2014 / Published online: 4 July 2014
© American Aging Association 2014

**Abstract** The benefits of exercise and the element selenium on mental health and cognitive performance are well documented. The purpose of the present study was to investigate whether the intake of a diet supplemented with diphenyl diselenide [$(PhSe)_2$] and the swimming exercise could enhance memory in old Wistar rats. Male Wistar rats (24 months) were fed daily with standard diet chow or standard chow supplemented with 1 ppm of $(PhSe)_2$ during 4 weeks. Animals were submitted to swimming training with a workload (3 % of body weight, 20 min/day for 4 weeks). After 4 weeks, the object recognition test (ORT) and the object location test (OLT) were performed. The results of this study demonstrated that intake of a supplemented diet with $(PhSe)_2$ and swimming exercise was effective in improving short-term and long-term memory as well as spatial learning, increasing the hippocampal levels of phosphorylated cAMP-response element-binding protein (CREB) in old rats. This study also provided evidence that $(PhSe)_2$-supplemented diet facilitated memory of old rats by modulating cAMP levels and stimulating CREB phosphorylation, without altering the levels of Akt.

J. L. Cechella · M. R. Leite · A. R. Rosario · T. B. Sampaio · G. Zeni (✉)
Laboratório de Síntese, Reatividade e Avaliação Farmacológica e Toxicológica de Organocalcogênios, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97105-900, Brazil
e-mail: gzeni@ufsm.br

**Keywords** Selenium · Organoselenium · Exercise · Memory · Age

## Introduction

The benefits of exercise and physical fitness on mental health and cognitive performance are well documented (Chaddock et al. 2010; Colcombe and Kramer 2003; Colcombe et al. 2006; Cotman and Berchtold 2002; Cotman et al. 2007; Kramer and Erickson 2007; Vaynman and Gomez-Pinilla 2005). Recently, studies have been carried out in humans using noninvasive brain imaging techniques to investigate exercise-related changes in brain structure (Chaddock et al. 2010; Erickson et al. 2009, 2011). Some of the most compelling evidence of exercise-mediated brain changes has been found in the hippocampus, a brain structure involved with memory as well as stress regulation (Kim and Diamond 2002; Small et al. 2011). Persuasive evidence have indicated that physical activity acts as a protective factor in the incidence of dementia (Aarsland et al. 2010) and that regular aerobic exercise can reduce rates of cognitive decline in older adults (Hillman et al. 2008). Consistent with human research, rodent studies demonstrated that exercise facilitated acquisition and/or retention in various hippocampal-dependent tasks (Greenwood et al. 2007; Nichol et al. 2007; Radak et al. 2006; Schweitzer et al. 2006; van Praag et al. 2005; Vaynman et al. 2004) and elevated brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and cAMP-response element-binding protein (CREB) levels

(Molteni et al. 2002; Shen et al. 2001; Vaynman et al. 2007).

Selenium (Se) is a fundamental component of the living cells of a variety of organisms. It is found in a limited number of molecules and will interact only with few functional groups of biomolecules (thiol-thiolate groups) or with strong pro-oxidant peroxides (Arner 2009). Evidence has been found to suggest that the trace element Se may influence cognitive functions (Akbaraly et al. 2007; Smorgon et al. 2004). This way, our research group has investigated the pharmacological properties of organoselenium compounds in animal models (Nogueira and Rocha 2011; Nogueira et al. 2004). It has been reported that organoselenium compound diphenyl diselenide [$(PhSe)_2$] displays cognitive-enhancing properties in the object recognition test (ORT) (Rosa et al. 2003) and in the Y-maze and Morris water maze tests (Souza et al. 2010; Stangherlin et al. 2008) in rodents.

Based on the abovementioned, this study aimed to investigate whether the intake of a diet supplemented with diphenyl diselenide and the swimming exercise in old Wistar rats could enhance memory of these animals.

## Materials and methods

### Animals

Adult (4 months) and old (24 months) 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, the Federal University of Santa Maria, Brazil.

### Drugs

Diphenyl diselenide [$(PhSe)_2$] was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described (Paulmier 1986). Analysis of the $^1$H NMR and $^{13}$C NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of $(PhSe)_2$ (99.9 %) was determined by GC/MS.

All other chemicals were obtained from analytical grade and standard commercial suppliers.

### Experimental design

Figure 1 illustrates the experimental design of this study. The animals were divided into one group of adult sedentary (animals that did not swim, adult control group) and four groups of old animals: old sedentary (animals that did not swim, control group), exercise (swimming-trained animals, exercise group), sedentary+$(PhSe)_2$ (animals that did not swim and were supplemented with 1 ppm $(PhSe)_2$ diet, $(PhSe)_2$ group), and exercise+$(PhSe)_2$ (swimming-trained animals and supplemented with 1 ppm $(PhSe)_2$ diet, exercise+$(PhSe)_2$ group). All protocol steps used in this study are described below.

### Dietary supplementation

The animals were fed daily with standard diet chow or standard chow supplemented with 1 ppm of $(PhSe)_2$ during 4 weeks. The supplementation began after the period of adaptation to swimming training. The preparation and concentration of supplemented standard chow was based on a previous study (de Bem et al. 2009). The standard diet was pulverized with ethyl alcohol, whereas the supplemented diet was pulverized with $(PhSe)_2$ [1 mg of $(PhSe)_2$/100 g standard chow] dissolved in ethyl alcohol (1 mg/100 ml). The standard and supplemented diets were stored at room temperature for 3 h to evaporate the alcohol and then kept at 4 °C for no more than 1 week.

### Exercise training protocol

Twenty-four-month-old rats were submitted to the pre-training session with duration of 20 min/day for 1 week (exercise and exercise+$(PhSe)_2$ groups). After adaptation, rats were submitted to a swimming training session with a workload (3 % of body weight, 20 min/day for 4 weeks) (Ravi Kiran et al. 2004). The swimming training was performed between 13:00 and 15:00 p.m in water at a temperature of 32 °C±1. Rats from sedentary and sedentary+$(PhSe)_2$ groups were placed in the bottom of a separate tank with shallow water (5 cm) at 32 °C±1, without the workload (adaptation to the water). At the end of the exercise training, rats were towel-dried and returned to their respective cages.

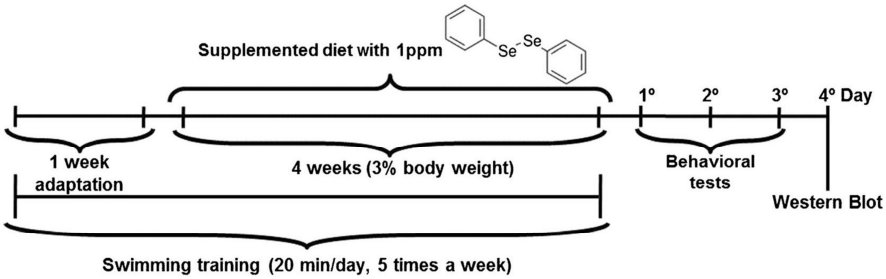



**Fig. 1** Experimental design of this study

Behavioral tests

Twenty-four hours after the last swimming training day, the animals were submitted to behavioral tests (Fig. 1).

Object recognition test

All animals were submitted to a habituation session where they were allowed to freely explore the open field for 5 min. No objects were placed in the box during the habituation trial (de Lima et al. 2005). Twenty-four hours after arena exploration, training was conducted by placing individual rats for 5 min in the field, in which two identical objects (objects 1A and 2A; duple Lego toys) were positioned in two adjacent corners, 9 cm from the walls. In a short-term memory (STM) test given 1.5 h after training, the rats explored the open field for 5 min in the presence of one familiar (A) and one novel (B) object. All objects presented similar textures, colors, and sizes, but distinctive shapes. The results were expressed as exploratory preference; a recognition index was calculated for each animal by the ratio TB/(TA+TB)×100 [TA=time spent exploring the familiar object A; TB=time spent exploring the novel object B]. Between trials, the objects were washed with 10 % ethanol solution. In a long-term memory (LTM) test given 24 h after training, the same rats explored the field for 5 min in the presence of familiar object A and a novel object C (Stangherlin et al. 2009).

Object location test

The apparatus used for this test was the same field used in the ORT as the LTM objects (object A and object C). The object location test (OLT), a hippocampal-dependent spatial memory task, was performed to evaluate potential cognitive deficits resulting from aging. The period of acclimation was performed as in the ORT.

In the sample trial, objects A and C were placed in the apparatus as described in the ORT. After 5 min of the object exploration, the rats were returned to their home cages for a 4-h interval. Subsequently, in the test trial, object C was moved to a location that was diagonally opposite to object A, and the rat was left in the field for 5 min of exploration (De Rosa et al. 2005). The time spent exploring novel and familiar objects location was recorded. The exploration criterion and the results were expressed as in ORT.

Activity chamber

The spontaneous locomotor activity was evaluated in the activity chamber. The animals were pre-exposed to the chamber before testing, and activity was monitored under light and sound-attenuated conditions. Testing took place in a clear acrylic chamber (500×480×500 mm) equipped with 16 infrared sensors for the automatic recording of horizontal activity (Model EP149, Insight Instruments Ltda, São Paulo, Brazil). Each animal initially was placed in the center of the testing chamber and allowed to freely move while being tracked by an automated tracking system. The data (distance traveled and velocity) were collected and recorded during 5 min.

Western blot assay

After behavioral tests (Fig. 1), all animals were killed by decapitation, brains were collected, and hippocampus was separated.

Samples of hippocampus were homogenized in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, and centrifuged

(9,800×*g* at 4 °C for 5 min) to concentrate the proteins. The pellet was reconstituted in a buffer solution (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM $MgCl_2$, 1.5 mMKAc, 1 % NP-40, and protein inhibitor cocktail) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) and incubated for 30 min on ice followed by 10 min on ultrasonic bath, and then centrifuged (3,900×*g* for 10 min, at 4 °C). Hippocampal extracts were diluted to a final protein concentration 2 μg/ml in SDS-PAGE buffer. The samples (50 μg of protein) and pre-stained molecular weight standards (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) were separated on 12 % resolving with 4 % concentrating SDS-polyacrylamide electrophoresis gels. Proteins were transferred to PVDF membrane using Transfer-Blot® Turbo™ Transfer System (1.0 mA; 0.5 h). After blocking with 5 % BSA solution, the blots were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-Akt (serine/threonine protein kinase) and rabbit anti-phospho-Akt (Ser 473) (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-CREB (cAMP-response element-binding protein), and rabbit anti-phospho-CREB (Ser 133) (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Rabbit anti-β-actins (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were stained as an additional control of the protein loading. After primary antibodies incubation, membranes were washed and incubated with secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) for 1 h at room temperature and developed with chemiluminescence kit (Amersham, São Paulo/Brazil). Optical density (OD) 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 α-actin band. The results were showed by percentage of control of quantification of the phosphorylated ratio, OD of the phosphorylated band/OD of the total band.

### Protein determination

The protein concentration was determined based on a previously described method (Bradford 1976), using bovine serum albumin (1 mg/ml) as a standard.

### Statistical analysis

All experimental results are expressed as means±standard error medium (SEM). Statistical analysis was performed using a one-way ANOVA followed by the Newman-Keul's test for post hoc comparison when appropriate. A value of $P<0.05$ was considered to be significant.

## Results

There was no significant difference among adult control and old groups in the total time exploring both objects during training (data not shown).

### Short-term memory

Statistical analysis revealed that percentage of preference for the new object was reduced in the old control group. One-way ANOVA [$F_{(4,20)}=13.94, P<0.0001$] showed that exercise or $(PhSe)_2$-supplemented diet increased the percentage preference of old rats when compared to old control rats. The association of swimming exercise and $(PhSe)_2$-supplemented diet enhanced the percentage of preference to new object in old rats when compared to all groups (Fig. 2a).

### Long-term memory

One-way analysis showed the effect of age in the LTM. Old control rats had lower percentage of preference for the new object than adult control rats (Fig. 2b).

The one-way analysis [$F_{(4,20)}=10.73, P<0.0001$] of percentage preference in the LTM revealed that the association of swimming exercise and $(PhSe)_2$-supplemented diet or $(PhSe)_2$-supplemented diet enhanced this parameter of memory in old rats. The percentage of preference was better in the swimming exercise and $(PhSe)_2$-supplemented diet group than in the adult control group. The swimming exercise did not ameliorate the performance in the LTM (Fig. 2b).

### Object location test

All situations, swimming exercise or $(PhSe)_2$-supplemented diet or their association, were effective to improve the percentage of preference in the OLT in old rats (Fig. 2c). The swimming exercise and the association of exercise and $(PhSe)_2$-supplemented diet increased the percentage of preference of old rats in the OLT when compared to adult control rats [$F_{(4,19)}=7.5$, $P=0.0008$] (Fig. 2c).

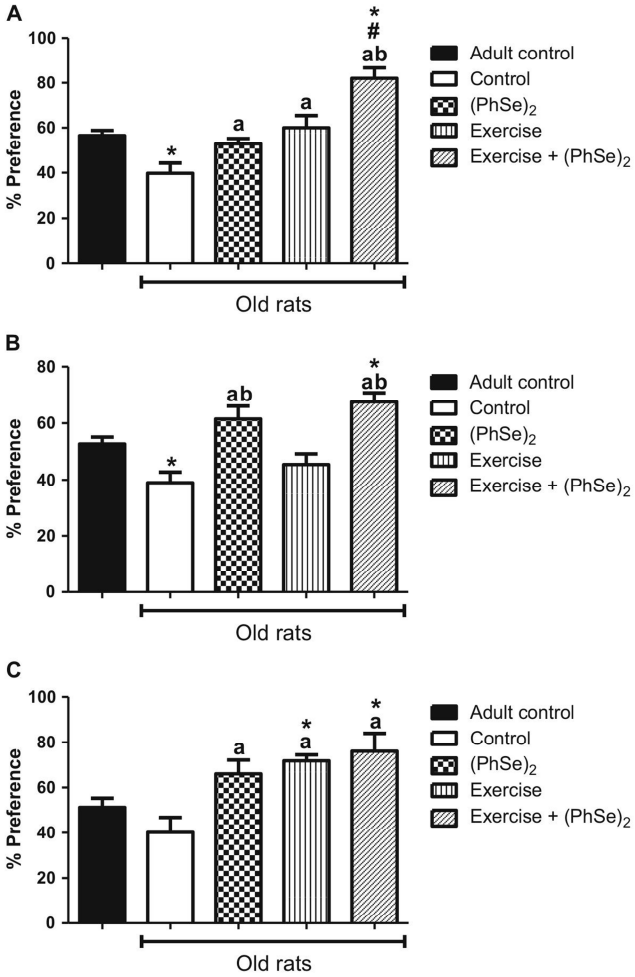



**Fig. 2** Effect of $(PhSe)_2$-supplemented diet (1 ppm for 4 weeks) and swimming exercise on the short-term memory (STM) (**a**) and long-term memory (LTM) (**b**) of adult control and old rats in the object recognition test. Object recognition test was carried out 48 h after the last training exercise. Recognition memory test was performed after 1.5 and 24 h of training for the STM and LTM, respectively. Object location test (**c**) was performed after 4 h of training for LTM. Values are expressed as the mean ±SEM ($n$=4–6 rats/group). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman-Keul's test for post hoc comparison when appropriate. *$P$<0.05 as compared to adult control rats; $^{a}P$<0.05 as compared to old control rats; #$P$<0.05 as compared to $(PhSe)_2$-treated rats; $^{b}P$<0.05 as compared to exercised rats

## Activity chamber

The one-way analysis showed the effect of age in traveled distance [$F_{(4,23)}$=7.12, $P$=0.007], velocity [$F_{(4,21)}$=7.18, $P$=0.008], crossings [$F_{(4,22)}$=6.68, $P$=0.0011], and [$F_{(4,21)}$=39.00, $P$<0.0001]. Swimming exercise, $(PhSe)_2$-supplemented diet, or their association was not effective in enhancing distance, velocity, and the number of crossings reduced in old rats. The number of rearings of old rats was increased in all situations (swimming exercise or $(PhSe)_2$-supplemented diet or their association) (Table 1).

## CREB and Akt

Figure 3a illustrates pCREB/CREB ratio in the hippocampus in rats. One-way analysis of pCREB/CREB ratio [$F_{(4,11)}$=10.87; $P$=0.0008] revealed the effect of age. pCREB/CREB ratio was lower in old control rats than in adult control rats. Swimming exercise, $(PhSe)_2$-supplemented diet, or their association were effective in increasing pCREB/CREB ratio in old rats. One-way ANOVA showed that exercise and $(PhSe)_2$-supplemented diet increased the percentage preference of old rats when compared to adult control rats.

**Table 1** Effect of $(PhSe)_2$-supplemented diet (1 ppm for 4 weeks) and swimming exercise on the locomotor behavior of adult control and old rats

| | Distance (m) | Velocity (mm/s) | Crossings | Rearings |
|---|---|---|---|---|
| Adult control | 21.39±2.94 | 77.45±11.14 | 46.71±4.32 | 24.67±1.25 |
| Control | 8.48±2.61* | 32.72±8.88* | 23.0±3.39* | 4.4±0.40* |
| $(PhSe)_2$ | 7.08±1.27* | 25.86±4.91* | 25.0±2.28* | 11.0±1.7*[a] |
| Exercise | 8.51±1.30* | 34.75±5.12* | 34.4±3.57* | 18.4±1.5*[a#] |
| Exercise+$(PhSe)_2$ | 10.74±2.02* | 36.14±6.21* | 27.0±5.14* | 13.80±0.91*ab |

Values are expressed as the mean±SEM ($n$=5–6 rats/group). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman-Keul's test for post hoc comparison when appropriate.

*$P$<0.05 as compared to adult control rats; [a] $P$<0.05 as compared to old control rats; [b] $P$<0.05 as compared to exercised rats; [#] $P$<0.05 as compared to $(PhSe)_2$-treated rats

The ratio of pAkt/Akt in the hippocampus of rats is shown in Fig. 3b. The effect of age was not observed in the ratio of pAkt/Akt. One-way analysis revealed that swimming exercise increased pAkt/Akt ratio in old rats. $(PhSe)_2$-Supplemented diet suppressed the effect of swimming exercise in pAkt/Akt ratio. Exercise increased the pAkt/Akt ratio in old rats when compared to adult control rats [$F_{(4,11)}$=4.61, $P$=0.0198].

## Discussion

The present study showed that intake of a supplemented diet with $(PhSe)_2$ and swimming exercise was effective in improving short-term and long-term memory as well as spatial learning, increasing the hippocampal levels of pCREB in old rats.

Experimental data support the idea that $(PhSe)_2$ (Rosa et al. 2003; Stangherlin et al. 2008) and exercise (Cotman and Engesser-Cesar 2002; van Praag 2009) improve cognitive function and learning and enhance acquisition and retention of spatial memory in rodents. The association of swimming exercise with $(PhSe)_2$-supplemented diet restored cognitive deficits impaired by age, enhancing short-term, long-term, and spatial memories. The effects of exercise and $(PhSe)_2$-supplemented diet on memory were accompanied by an increase in p-CREB/CREB ratio, which were higher than that of found in the adult control group. Reinforcing our results on p-CREB/CREB ratio, a decrease in p-CREB levels has been associated with age-induced memory impairment (Brightwell et al. 2007; Morris and Gold 2012) and deterioration of hippocampal plasticity (Wei et al. 2012). This result allows us to propose that swimming exercise and $(PhSe)_2$-supplemented diet improved memory and increased hippocampal p-CREB levels, without altering the levels of p-Akt. It is important to note that $(PhSe)_2$-supplemented diet blocked the effect of swimming exercise in increasing the phosphorylation of Akt. This is an intricate effect of $(PhSe)_2$-supplemented diet which deserves further investigation.

Moreover, the results on the object recognition test demonstrated that association of swimming exercise with $(PhSe)_2$-supplemented diet had additive effects only in short-term memory of old rats. Mechanisms to support the additive effects of swimming exercise with $(PhSe)_2$-supplemented diet may involve the cAMP/protein kinase A pathway and/or the mitogen activated protein pathway as well as hippocampal neurogenesis, reduction of oxidative stress, and increased brain-derived neurotrophic factor levels (Aguiar et al. 2011; Altarejos and Montminy 2011; Cotman and Engesser-Cesar 2002; Kim et al. 2013; Kwon et al. 2013; Leite et al. 2014; Nogueira et al. 2001; Serezani et al. 2008; Suzuki et al. 2011; van Praag 2009). In any case, the question that remains open is how $(PhSe)_2$ and swimming exercise interacts at a molecular level to enhance memory in old rats.

Experimental evidence has indicated that $(PhSe)_2$ crosses the blood-brain barrier and increases the selenium levels in the brain (Maciel et al. 2003; Nogueira et al. 2004; Prigol et al. 2009). With agreement with Stangherlin et al. (2008), who demonstrated that $(PhSe)_2$ enhances memory in adult rats, $(PhSe)_2$-supplemented diet was effective in restoring cognitive deficits caused by age in short-term and long-term memory as well as in spatial learning. Our previous study demonstrated that $(PhSe)_2$ increases the basal adenylate cyclase

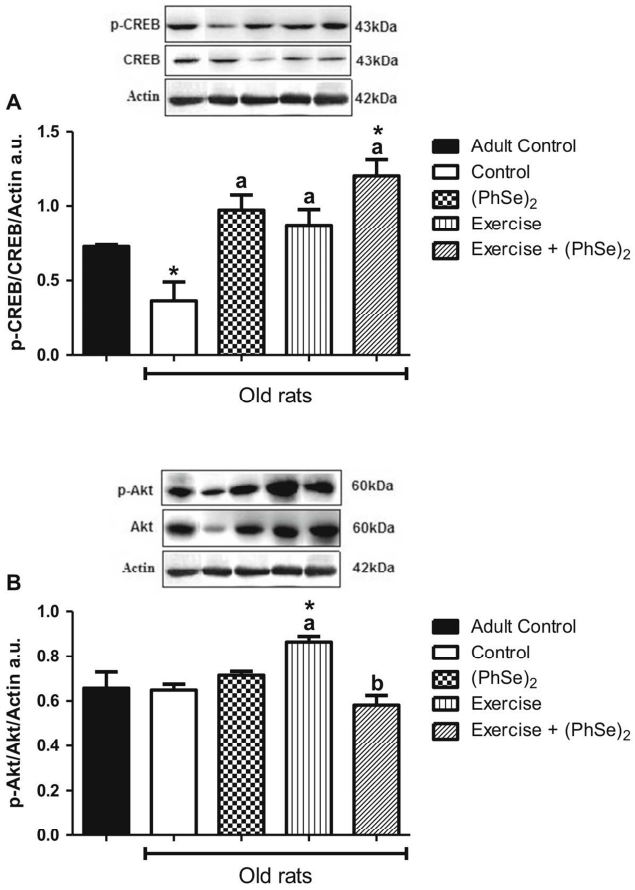



**Fig. 3** Effect of $(PhSe)_2$-supplemented diet (1 ppm for 4 weeks) and swimming exercise on pCREB/CREB ratio (**a**) and pAkt/Akt ratio (**b**) in the hippocampus of adult control and old male rats. Values are expressed as the mean±SEM ($n$= 3–4 rats/group). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by the Newman-Keul's test for post hoc comparison when appropriate. *$P$<0.05 as compared to adult control rats; $^{a}P$<0.05 as compared to old control rats; $^{b}P$<0.05 as compared to exercised rats. Representative qualitative Western blotting analysis at the top of the figure, graphic shows representative quantification of the proteins immunocontent normalized to β-actin protein

activity, indicating a direct effect on adenylate cyclase (Nogueira et al. 2001). It is well known that cAMP is an important second messenger that modulates a variety of physiological and pathophysiological manifestations (Serezani et al. 2008). In addition, it has been reported that cAMP stimulates CREB phosphorylation (Altarejos and Montminy 2011). Therefore, we can assume that $(PhSe)_2$-supplemented diet facilitated memory of old rats by modulating cAMP levels and stimulating CREB phosphorylation, without altering the levels of Akt.

The physical exercise is an effective, inexpensive, and low-risk strategy for maximizing brain health in later life (Larson 2010). It is known that regular aerobic exercise increases capillary growth and dendritic connections in the hippocampus and results in improved cognitive functions (Cotman and Engesser-Cesar 2002), learning, and memory in old rats (van Praag 2009). In the present study, the swimming exercise program markedly improved age-related spatial learning corroborating previous studies in which exercise leads to improvements in hippocampal-dependent tasks such as spatial reference memory (Van der Borght et al. 2007; van Praag et al. 1999a, b). The swimming exercise also enhanced short-term memory in old rats. Moreover, the beneficial effects of exercise in memory were accompanied by the hippocampal activation of Akt and CREB signaling. The effects of exercise on p-CREB/CREB

and p-Akt/Akt are well reported in the literature (Aguiar et al. 2011; Chen and Russo-Neustadt 2009; Kim et al. 2013; Kwon et al. 2013; Suijo et al. 2013). The strong evidence linking CREB activity to neuronal plasticity and memory formation (Silva et al. 1998) suggests a direct effect of BDNF on exercise-induced improvements in learning and memory via CREB signaling (Shen et al. 2001; Suzuki et al. 2011; Vaynman et al. 2004) and Akt activation in the hippocampus of rodents (Aguiar et al. 2010; Chae and Kim 2009; Chen and Russo-Neustadt 2005, 2009).

Age-related locomotor declines were demonstrated in the present study. In fact, control old rats showed alterations in the distance traveled, velocity, crossings, and rearings. The association of $(PhSe)_2$-supplemented diet with swimming exercise or treatments isolated was not effective in improving the locomotor behaviors, excepting for the number of rearings, which were increased by all situations.

In conclusion, the results of the present study demonstrated that the association of $(PhSe)_2$-supplemented diet with swimming exercise enhanced novel object recognition memory in old rats. The enhancer effect of $(PhSe)_2$-supplemented diet and swimming exercise on memory was attributed to an increase in the levels of p-CREB.

**Acknowledgments** The financial support by UFSM, CAPES, FAPERGS/CNPq (PRONEX), and research grant FAPERGS no. 10/0711-6 is gratefully acknowledged. G.Z. is a recipient of CNPq fellowship.

**Conflict of interest** The authors declare no conflict of interests in the present study.

## References

Aarsland D, Sardahaee FS, Anderssen S, Ballard C (2010) Is physical activity a potential preventive factor for vascular dementia? A systematic review. Aging Ment Health 14: 386–395

Aguiar AS Jr, Boemer G, Rial D et al (2010) High-intensity physical exercise disrupts implicit memory in mice: involvement of the striatal glutathione antioxidant system and intracellular signaling. Neuroscience 171:1216–1227

Aguiar AS Jr, Castro AA, Moreira EL et al (2011) 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

Akbaraly TN, Hininger-Favier I, Carriere I, Arnaud J, Gourlet V, Roussel AM, Berr C (2007) Plasma selenium over time and cognitive decline in the elderly. Epidemiology 18:52–58

Altarejos JY, Montminy M (2011) CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. Nat Rev Mol Cell Biol 12:141–151

Arner ES (2009) Focus on mammalian thioredoxin reductases—important selenoproteins with versatile functions. Biochim Biophys Acta 1790:495–526

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248–254

Brightwell JJ, Smith CA, Neve RL, Colombo PJ (2007) Long-term memory for place learning is facilitated by expression of cAMP response element-binding protein in the dorsal hippocampus. Learn Mem 14:195–199

Chaddock L, Erickson KI, Prakash RS et al (2010) A neuroimaging investigation of the association between aerobic fitness, hippocampal volume, and memory performance in preadolescent children. Brain Res 1358:172–183

Chae CH, Kim HT (2009) Forced, moderate-intensity treadmill exercise suppresses apoptosis by increasing the level of NGF and stimulating phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the hippocampus of induced aging rats. Neurochem Int 55: 208–213

Chen MJ, Russo-Neustadt AA (2005) Exercise activates the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Brain Res Mol Brain Res 135:181–193

Chen MJ, Russo-Neustadt AA (2009) Running exercise-induced up-regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor is CREB-dependent. Hippocampus 19:962–972

Colcombe S, Kramer AF (2003) Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. Psychol Sci 14:125–130

Colcombe SJ, Erickson KI, Scalf PE et al (2006) Aerobic exercise training increases brain volume in aging humans. J Gerontol A: Biol Med Sci 61:1166–1170

Cotman CW, Berchtold NC (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. Trends Neurosci 25:295–301

Cotman CW, Engesser-Cesar C (2002) Exercise enhances and protects brain function. Exerc Sport Sci Rev 30:75–79

Cotman CW, Berchtold NC, Christie LA (2007) Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. Trends Neurosci 30:464–472

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

de Lima MN, Laranja DC, Caldana F, Bromberg E, Roesler R, Schroder N (2005) Reversal of age-related deficits in object recognition memory in rats with l-deprenyl. Exp Gerontol 40: 506–511

De Rosa R, Garcia AA, Braschi C, Capsoni S, Maffei L, Berardi N, Cattaneo A (2005) Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 102:3811–3816

Erickson KI, Prakash RS, Voss MW et al (2009) Aerobic fitness is associated with hippocampal volume in elderly humans. Hippocampus 19:1030–1039

Erickson KI, Voss MW, Prakash RS et al (2011) Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. Proc Natl Acad Sci U S A 108:3017–3022

Greenwood BN, Strong PV, Foley TE, Thompson RS, Fleshner M (2007) Learned helplessness is independent of levels of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus. Neuroscience 144:1193–1208

Hillman CH, Erickson KI, Kramer AF (2008) Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. Nat Rev Neurosci 9:58–65

Kim JJ, Diamond DM (2002) The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. Nat Rev Neurosci 3:453–462

Kim SE, Ko IG, Shin MS, Kim CJ, Jin BK, Hong HP, Jee YS (2013) Treadmill exercise and wheel exercise enhance expressions of neutrophic factors in the hippocampus of lipopolysaccharide-injected rats. Neurosci Lett 538:54–59

Kramer AF, Erickson KI (2007) Capitalizing on cortical plasticity: influence of physical activity on cognition and brain function. Trends Cogn Sci 11:342–348

Kwon DH, Kim BS, Chang H, Kim YI, Jo SA, Leem YH (2013) Exercise ameliorates cognition impairment due to restraint stress-induced oxidative insult and reduced BDNF level. Biochem Biophys Res Commun 434:245–251

Larson EB (2010) Prospects for delaying the rising tide of worldwide, late-life dementias. Int Psychogeriatr 22:1196–1202

Leite MR, Marcondes Sari MH, de Freitas ML, Oliveira LP, Dalmolin L, Brandao R, Zeni G (2014) Caffeine and diphenyl diselenide improve long-term memory impaired in middle-aged rats. Exp Gerontol 53:67–73

Maciel EN, Flores EM, Rocha JB, Folmer V (2003) Comparative deposition of diphenyl diselenide in liver, kidney, and brain of mice. Bull Environ Contam Toxicol 70:470–476

Molteni R, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2002) Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. Eur J Neurosci 16: 1107–1116

Morris KA, Gold PE (2012) Age-related impairments in memory and in CREB and pCREB expression in hippocampus and amygdala following inhibitory avoidance training. Mech Ageing Dev 133:291–299

Nichol KE, Parachikova AI, Cotman CW (2007) Three weeks of running wheel exposure improves cognitive performance in the aged Tg2576 mouse. Behav Brain Res 184:124–132

Nogueira CW, Rocha JB (2011) Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. Arch Toxicol 85:1313–1359

Nogueira CW, Rotta LN, Perry ML, Souza DO, da Rocha JB (2001) Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride affect the rat glutamatergic system in vitro and in vivo. Brain Res 906:157–163

Nogueira CW, Zeni G, Rocha JB (2004) Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. Chem Rev 104:6255–6285

Paulmier C (1986) Selenoorganic functional groups. In: Paulmier C (ed) Selenium reagents and intermediates in organic synthesis, 1st edn. Pergamon Press, Oxford, pp 25–51

Prigol M, Schumacher RF, WayneNogueira C, Zeni G (2009) Convulsant effect of diphenyl diselenide in rats and mice and its relationship to plasma levels. Toxicol Lett 189:35–39

Radak Z, Toldy A, Szabo Z et al (2006) The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. Neurochem Int 49:387–392

Ravi Kiran T, Subramanyam MVV, 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 137:187–196

Rosa RM, Flores DG, Appelt HR, Braga AL, Henriques JA, Roesler R (2003) Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. Neurosci Lett 341:217–220

Schweitzer NB, Alessio HM, Berry SD, Roeske K, Hagerman AE (2006) Exercise-induced changes in cardiac gene expression and its relation to spatial maze performance. Neurochem Int 48:9–16

Serezani CH, Ballinger MN, Aronoff DM, Peters-Golden M (2008) Cyclic AMP: master regulator of innate immune cell function. Am J Respir Cell Mol Biol 39:127–132

Shen H, Tong L, Balazs R, Cotman CW (2001) Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. Neuroscience 107:219–229

Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S (1998) CREB and memory. Annu Rev Neurosci 21:127–148

Small SA, Schobel SA, Buxton RB, Witter MP, Barnes CA (2011) A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. Nat Rev Neurosci 12:585–601

Smorgon C, Mari E, Atti AR, Dalla Nora E, Zamboni PF, Calzoni F, Passaro A, Fellin R (2004) Trace elements and cognitive impairment: an elderly cohort study. Arch Gerontol Geriatr Suppl 9:393–402

Souza AC, Bruning CA, Leite MR, Zeni G, Nogueira CW (2010) Diphenyl diselenide improves scopolamine-induced memory impairment in mice. Behav Pharmacol 21:556–562

Stangherlin EC, Luchese C, Pinton S, Rocha JB, Nogueira CW (2008) Sub-chronical exposure to diphenyl diselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats. Brain Res 1201:106–113

Stangherlin EC, Rocha JB, Nogueira CW (2009) Diphenyl ditelluride impairs short-term memory and alters neurochemical parameters in young rats. Pharmacol Biochem Behav 91:430–435

Suijo K, Inoue S, Ohya Y et al (2013) Resistance exercise enhances cognitive function in mouse. Int J Sports Med 34:368–375

Suzuki A, Fukushima H, Mukawa T et al (2011) Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. J Neurosci 31:8786–8802

Van der Borght K, Havekes R, Bos T, Eggen BJ, Van der Zee EA (2007) Exercise improves memory acquisition and retrieval in the Y-maze task: relationship with hippocampal neurogenesis. Behav Neurosci 121:324–334

van Praag H (2009) Exercise and the brain: something to chew on. Trends Neurosci 32:283–290

van Praag H, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999a) Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 96:13427–13431

van Praag H, Kempermann G, Gage FH (1999b) Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. Nat Neurosci 2:266–270

van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH (2005) Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. J Neurosci 25:8680–8685

Vaynman S, Gomez-Pinilla F (2005) License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. Neurorehabil Neural Repair 19:283–295

Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2004) Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. Eur J Neurosci 20:2580–2590

Vaynman S, Ying Z, Gomez-Pinilla F (2007) The select action of hippocampal calcium calmodulin protein kinase II in mediating exercise-enhanced cognitive function. Neuroscience 144:825–833

Wei Z, Belal C, Tu W, Chigurupati S, Ameli NJ, Lu Y, Chan SL (2012) Chronic nicotine administration impairs activation of cyclic AMP-response element binding protein and survival of newborn cells in the dentate gyrus. Stem Cells Dev 21:411–422

## 3.2 MANUSCRITO 1:

Molecular Neurobiology

# Neuroprotective Benefits of Aerobic Exercise and Organoselenium Dietary Supplementation in Hippocampus of Old Rats

--Manuscript Draft--

| | |
|---|---|
| Manuscript Number: | MOLN-D-16-01201 |
| Article Type: | Original Article |
| Keywords: | aerobic exercise, diet, selenium, neuroprotection, apoptosis, aging |
| Corresponding Author: | Cristina Wayne Nogueira, Ph.D<br>Universidade Federal de Santa Maria<br>Santa Maria, Rio Grande do Sul BRAZIL |
| First Author: | Cristina Wayne Nogueira, Ph.D |
| Order of Authors: | Cristina Wayne Nogueira, Ph.D |
| | José Luiz Cechella Jr, Master |
| | Marlon Regis Leite, PhD |
| | Simone Pinton, PhD |
| | Gilson Zeni, PhD |
| Abstract: | The progressive decline of neurological functions, such as learning and memory, is an unavoidable consequence of aging which occurs for many reasons. Regular exercise and the organoselenium compound, diphenyl diselenide (PhSe)2, improve cognitive function. The purpose of the present study was to investigate the effects of physical exercise and (PhSe)2 on hippocampal markers of neuroprotection, apoptosis and neuroinflammation to figure out the mechanisms involved in beneficial effects of this concomitant intervention in old rats. Male Wistar Rats (27 months) were fed daily with standard diet or a standard chow supplemented with 1 ppm of (PhSe)2 during 4 weeks. Animals were submitted to swimming training with a workload (1% of body weight, 20 min/day for 4 weeks). After 4 weeks, the brains of animals were collected and samples of hippocampus were prepared for the assay. The results of this study demonstrated that intake of a supplemented diet and swimming exercise promoted neuroprotection and reduced glial activation (GFAP and Iba-1) and apoptosis in hippocampus of aged rats. |

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

December, 2016

Dear Editor,

We are sending you our manuscript entitled "Neuroprotective benefits of aerobic exercise and organoselenium dietary supplementation in hippocampus of old rats" to be considered for publication, as a original paper, in *Molecular Neurobiology.*

The manuscript and the data reported here have not been published previously and they are not under consideration for publication elsewhere. The purpose of the present study was to investigate the effects of both physical exercise and a diet supplemented with an organoselenium compound, $(PhSe)_2$, on the levels of hippocampal protein markers of neuroprotection, apoptosis and neuroinflammation to try to figure out the possible beneficial effects of this concomitant intervention in old rats.

All listed authors have contributed significantly to the manuscript and consent to their names on the manuscript. There is no conflict of interest in the conduct and reporting of research (e.g., financial interests in a test or procedure, funding by pharmaceutical companies for drug research).

I thank you in advance for your kind attention.

Sincerely,

Cristina Nogueira
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.
Phone: 55-55-3220- 9611
FAX: 55-55-3220-8978
E-mail:criswn@ufsm.br

Manuscript Click here to download Manuscript Manuscript.docx

# Neuroprotective Benefits of Aerobic Exercise and Organoselenium Dietary Supplementation in Hippocampus of Old Rats

José L. Cechella,[1] Marlon R. Leite,[1] Simone Pinton,[2] Gilson Zeni[1], Cristina W. Nogueira,[1*]

[1]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

[2]Universidade Federal do Pampa, Campus Uruguaiana, CEP 97500-701, Rio Grande do Sul, Brasil

*Correspondence should be sent to:

Cristina Wayne Nogueira

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

Phone: 55-55-3220-8140

FAX: 55-55-3220-8978

E-mail: criswn@ufsm.br

Abstract

The progressive decline of neurological functions, such as learning and memory, is an unavoidable consequence of aging which occurs for many reasons. Regular exercise and the organoselenium compound, diphenyl diselenide $(PhSe)_2$, improve cognitive function. The purpose of the present study was to investigate the effects of physical exercise and $(PhSe)_2$ on hippocampal markers of neuroprotection, apoptosis and neuroinflammation to figure out the mechanisms involved in beneficial effects of this concomitant intervention in old rats. Male Wistar Rats (27 months) were fed daily with standard diet or a standard chow supplemented with 1 ppm of $(PhSe)_2$ during 4 weeks. Animals were submitted to swimming training with a workload (1% of body weight, 20 min/day for 4 weeks). After 4 weeks, the brains of animals were collected and samples of hippocampus were prepared for the assay. The results of this study demonstrated that intake of a supplemented diet and swimming exercise promoted neuroprotection and reduced glial activation (GFAP and Iba-1) and apoptosis in hippocampus of aged rats.

Keywords: aerobic exercise, diet, selenium, neuroprotection, apoptosis, aging

**Introduction**

Aging is associated with a decline in physical health and cognitive abilities, perhaps the most widely confirmed psychological change with age is the decline in memory [1]. Hippocampus is an important brain area for learning and memory and where neurogenesis occurs throughout adulthood, however, the formation of new neurons decreases substantially with age [2].

Neurotrophins are neurotrophic factors that in both embryonic and adult brain promote the development and survival of neurons. Among them is the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) that in its mature form stands out for its ability to regulate synaptic plasticity and cognitive function by specific pathways [3]. In contrast to BDNF, c-Jun N-terminal Kinases (JNKs) are proteins involved in the cellular stress response triggering processes associated to loss of neurons such as apoptosis and inflammation. An increase of the intrinsic apoptotic pathway activation with consequent activation of caspase-3 inhibits the DNA repair capacity by poly (ADP-ribose) polymerase) (PARP) causing cellular disequilibrium and death in the old rat brain [4,5]. Moreover, exacerbated activation of both astrocytes and microglia cells increases inflammatory mediators and reactive species production leading to a neuroinflammatory state. These two processes cause hippocampal deterioration and this contribute to the impairment of cognitive function [6,7].

Although the aging process is not fully understood, our knowledge of the molecular basis of this complex process has increased considerably in recent years. This fact enables the development of new strategies to slow the effects of aging. In both young and old brain, the neurotrophins promote the development and survival of neurons, among them, BDNF stands out for its ability to regulate synaptic plasticity and cognitive function [3]. On the other hand, apoptosis is involved in aging and age-related disease and this process is extremely regulated. JNKs also phosphorylate non-nuclear proteins, including members of the Bcl-2 family that reside at the mitochondria [8]. In the old rat brain, the reduction in the Bcl-2 levels facilitate cytochrome c release and activation of caspase-3 that induces the cleavage of PARP inhibiting their DNA repair capacity causing cellular disequilibrium and death [4,5].

Moreover, exaggerate activation of astrocytes and microglial cells increases inflammatory cytokines production and hippocampal deterioration, and this inflammatory response might greatly contribute to the impairment of memory function [6,7].

Regular exercise has multi-system anti-aging effects. More specifically with respect to the brain , evidence has been found to suggest that physical exercise increases neurogenesis in the hippocampal

dentate gyrus which improves learning ability and memory function in aged rodents [9-11]. For decades, several studies have shown a close relationship between nutritional deficiency and diseases associated with aging [12]. Selenium (Se) is an essential micronutrient for a wide range of living organisms, including human beings [13]. Se plays a key role in protecting cells against free radical attack and in inflammation and immunity [14]. Regarding organoselenium compounds, diphenyl diselenide $(PhSe)_2$ improves cognitive function of rodents [11,15,16] and reduces plasma levels of inflammatory cytokines in aged rats [17].

Considering what was mentioned before, the purpose of the present study was to investigate the effects of physical exercise and $(PhSe)_2$ on hippocampal markers of neuroprotection, apoptosis and neuroinflammation to figure out the mechanisms involved in beneficial effects of this concomitant intervention in old rats.

## Materials and methods

### Animals

The experiments were carried out using male adult (4 months) and old (27 months) Wistar rats from a local breeding colony. The animals were housed in cages (2-3 animals per cage), with free access to food and tap 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, the Federal University of Santa Maria, Brazil. The present experimental study was approved by the Institutional Ethics Committee on Care and registered under the number of 5394050115.

### Drugs

Diphenyl diselenide $(PhSe)_2$was prepared and characterized in our laboratory by the method previously described [18]. Analysis of the $^{1}H$ NMR and $^{13}C$ NMR spectra showed analytical and spectroscopic data in full agreement with its assigned structure. The chemical purity of $(PhSe)_2$ (99.9%) was determined by GC/MS.All other chemicals were obtained from analytical grade and standard commercial suppliers.

### Experimental protocol

In this experimental protocol the animals were divided in five groups (nine animals in each group). Rats were assigned in the sedentary or swimming exercise group supplemented or not with a diet containing 1 mg of $(PhSe)_2$/1000g standard chow.

The standard diet chow was pulverized with ethanol, whereas the supplemented diet was pulverized with $(PhSe)_2$ 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 $4^0$C for no more than 1 week [19]. The standard and supplemented diets were supplied *ad libitum* for 30 days. The level of $(PhSe)_2$ and protocol regimen used in this study were chosen based on our previous study [11]..

Animals of swimming exercise and swimming exercise plus $(PhSe)_2$ groups were submitted to the pre-training period (20 min/day, 5 days). After the swimming adaptation, rats were subjected to swimming training with a workload (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) [20]. Swimming training was performed in water at a temperature of $32^0$C ± 1 between 9.00 and 11.00 a.m. Rats from adult sedentary control, old sedentary control and $(PhSe)_2$ groups were placed in the bottom of a separate tank with shallow water (5 cm) at $32^0$C ± 1, without the workload (adaptation to the water). At the end of the exercise training, rats were towel-dried and returned to their respective cages.

Twenty-four h after the last swimming training, the animals were submitted to the memory behavioral tests (object recognition and object location tasks), aiming to mimic the protocol experimental carried out in our previous study [11]. After the tests, the animals were killed by decapitation, the brains were collected and samples of hippocampus were prepared for the western blot assay (N= 6 rats/group).

For immunohistochemistry assay, the rats (N= 4 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 h.

**Immunohistochemistry**

The dehydrated brains were embedded in paraffin and hippocampus sections (8 μm) were cut in a microtome and mounted on SuperFrost-Plus glass slides (Thermo 213 Scientific, Rockford, IL, USA). Paraffin-embedded brain sections were deparaffinized, 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 (PBS) 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 μg/ml DAPI (Invitrogen) for 10 min. The sections were washed three times in PBS and mounted on slides with Fluor Save (Merck) and covered with cover slips. The images of hippocampus sections were obtained on an Axioskop fluorescence microscope (Carl Zeiss) and examined with ImageJ software.

**Western blot**

The samples of hippocampus were homogenized in 400 μl 5% sodium dodecyl sulfate (SDS) with protein inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA). The hippocampus extracts were diluted to a final protein concentration of 2 μg/μl 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 μg 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 μm, 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 primary antibodies as shown in Table 1. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) 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.

Table 1- List of primary antibodies and their dilutions

| Name of antibody | Type | Company | Dilution |
|---|---|---|---|

| | | | |
|---|---|---|---|
| Iba-1 | Rabbit | Wako | 1:1000 |
| GFAP | Mouse | Sigma-Aldrich | 1:1000 |
| NeuN | Mouse | Millipore | 1:1000 |
| pJNK and JNK | Mouse | Santa Cruz | 1:1000 |
| mBDNF | Rabbit | Abcam | 1:2000 |
| proBDNF | Rabbit | Abcam | 1:2000 |
| pERK and ERK | Rabbit | Cell Signaling | 1:1000 |
| pPKc | Goat | Santa Cruz | 1:1000 |
| PKc | Rabbit | Santa Cruz | 1:1000 |
| caspase 3 | Rabbit | Santa Cruz | 1:1000 |
| cleaved caspase 3 | Rabbit | Santa Cruz | 1:1000 |
| Bax | Mouse | Santa Cruz | 1:1000 |
| Bcl2 | Rabbit | Santa Cruz | 1:2000 |
| PARP | Rabbit | Cell Signaling | 1:1000 |
| GAPDH | Rabbit | Cell Signaling | 1:5000 |

Iba-1(ionized calcium binding adapter molecule 1), GFAP (glial fibrillary acidic protein), NeuN (neuronal nuclear protein), JNK (C-Jun N-terminal kinase), BDNF brain-derived neurotrophic factor), ERK (extracellular-signal-regulated kinases), PKc (protein kinase c), PARP (poly (ADP-ribose) polymerase), GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

**Statistical analysis**

Data are expressed as means ± 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.

**Results**

**Swimming exercise plus $(PhSe)_2$ and swimming exercise increase the levels of protein markers of neurogenesis and neuroprotection**

Figure 1 panels A-D shows that swimming exercise plus $(PhSe)_2$ or swimming exercise increased the levels of proteins involved in neurogenesis.

Figure 1A shows the reduction in mBDNF levels in the hippocampus of old rats when compared with those of the control group. Statistical analysis (one-way ANOVA) revealed a significant effect of swimming exercise plus $(PhSe)_2$ or swimming exercise in increasing the mBDNF levels in hippocampus of old rats ($F_{(4,25)} = 8.178$, $P= 0.0002$).

The one-way ANOVA analysis demonstrated a significant increase of p-PKc/PKc ratio (Figure 1B) ($F_{(4,25)} = 8.445$, $P= 0.0002$) and pERK/ERK ratio (Figure 1C) ($F_{(4,25)} = 8.4826$, $P= 0.005$) in the hippocampus of old rats submitted to swimming exercise or swimming exercise plus a diet supplemented with $(PhSe)_2$ when compared to those of the control old rats.

Statistical analysis (one-way ANOVA) of the NeuN levels showed a significant decrease of this protein in the hippocampus of control old rats when compared to those of the adult rats. An increase in the NeuN levels was found in the hippocampus of rats from swimming exercise or swimming exercise plus $(PhSe)_2$ groups ($F_{(4,25)} = 6.91$, $P= 0.0007$) (Figure 1D).

**Swimming exercise plus $(PhSe)_2$, $(PhSe)_2$ and swimming exercise decrease the activation of protein markers related to apoptosis and neuroinflammation**

The one-way ANOVA analysis demonstrated a significant increase of proBDNF levels (Figure 2A) in the old control group and swimming exercise plus $(PhSe)_2$, $(PhSe)_2$ and swimming exercise groups were effective in reducing this increase ($F_{(4,25)} = 14.19$, $P< 0.0001$).

A significant increase in GFAP levels in the hippocampus of old rats when compared to those of the old control group was demonstrated by the one-way ANOVA analysis. GFAP levels were reduced in the hippocampus of rats from swimming exercise plus $(PhSe)_2$ or swimming exercise groups ($F_{(4,25)} = 14.56$, $P< 0.0001$) (Figure 2D), these results were further confirmed by immunohistochemistry analysis ($F_{(4,15)} = 12.29$, $P= 0.0001$) (Figure 3A-F).

Figure 4 shows a decrease in the levels of proteins involved in apoptosis. The increase in p-JNK can change the levels of reactive oxygen species, protein synthesis inhibitors, and a variety of stress stimuli activating inflammatory and apoptotic signals, as the increase of caspase-3 cleavage. Caspase-3 is one of the key executioners of apoptosis, as it is either partially or totally responsible for the proteolytic cleavage of many key proteins such as PARP. The one-way ANOVA analysis demonstrated a decrease of

p-JNK/JNK ratio ($F_{(4,25)}$ = 4.948, P= 0.0045) (Figure 4A), cleaved caspase-3/caspase-3 ratio ($F_{(4,20)}$ = 21.27, P< 0.0001) (Figure 4C) and cleaved PARP/full length PARP ($F_{(4,25)}$ = 5.454, P= 0.0027) (Figure 4D) in the hippocampus of old rats from swimming exercise plus $(PhSe)_2$, swimming exercise or $(PhSe)_2$groups when compared to the levels of these proteins in the hippocampus of old control rats.

The one-way ANOVA analysis indicated a significant increase in the levels of Bcl-2 ($F_{(4,25)}$ = 5.206, P= 0.0034) in the hippocampus of old rats from swimming exercise plus $(PhSe)_2$, $(PhSe)_2$ and swimming exercise groups when compared to those of the old control rats (Figure 4B).

Figures 5 and 6 show the representative qualitative images of western blotting analysis of figures 1, 2 and 4.

**Discussion**

The progressive decline of neurological functions, such as learning and memory, is an unavoidable consequence of aging which occurs for many reasons, including cumulative molecular/cellular damage during lifespan to failure of neurotrophic signaling and synaptic efficiency [21,22]. The understanding of aging-related alterations in brain structures and function has become a critical urge with the increased lifespan observed in the recent decades [23].

In the present study, the results showed that aerobic exercise and a diet supplemented with $(PhSe)_2$ promoted neuroprotection and reduced glial activation and apoptosis in hippocampus of aged rats. Accordingly, in our previous study [11] the combination of these therapies induced cognitive benefits in aged rats, which suggests that in some way these hippocampal proteins are related to the benefits of swimming exercise and $(PhSe)_2$ -supplemented diet in memory of old rats.

The mild chronic inflammatory activity is characteristic of aging cells, aged microglia can become more inflammatory than younger [24]. Activated microglia can release neurotrophic factors, proinflammatory cytokines, and many cytotoxic molecules [25,26]. Therefore evidence has been found to suggest that microglia activation leads to a deleterious environment and neurodegeneration [24]. In the present study, the activation status of microglia and astrocytes were investigated using Iba-1 and GFAP markers [27,28]. Our results revealed the reduction in the levels of both markers Iba-1 and GFAP in the hippocampus of old rats submitted to swimming exercise and fed a diet supplemented with $(PhSe)_2$. A reduction in GFAP positive immunoreactivity in the dentate gyrus of hippocampus of aged rats further supports these results [29].

The levels of proBDNF has been implicated in the regulation of pan-neurotrophin receptor $p75^{NTR}$ (a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily) that is related to apoptosis and inflammation. In the present study, old rats showed an increase of hippocampal proBDNF levels, which were reduced in hippocampus of old rats submitted to swimming exercise and supplemented with a diet containing $(PhSe)_2$. Furthermore, studies in other research laboratories show that deficiency in the conversion of pro-BDNF to mBDNF and its signaling via TrkB contributes to cognitive dysfunctions [30-32] and that the integrity of this signaling is affected by aging, being correlated to memory deficits in aged-rodents [33].

In the present study, the integrity of this signaling was affected by aging and the combined therapy promoted an increase in the levels of mBDNF and in the ratios of p-ERK/ERK and p-PKc/PKc levels, leading to an increase of NeuN levels in the hippocampus of old rats. Several kinases, such as PI3K-Akt, PKc, and ERK/1-2, are able to activate, by phosphorylation, the transcriptional regulator cyclic-AMP responsive-element binding protein (CREB)[34,35]. Accordingly, our previous study demonstrated that old rats submitted to swimming exercise and fed a $(PhSe)_2$-supplemented diet performed well in memory tests and had an increase in the hippocampal pCREB/CREB ratio [11].

Moreover, the overactivation of PKc and synaptic loss in the prefrontal cortex [36] and in the hippocampus of rats [37] has been related to the memory decline during aging. By contrast, pro-BDNF binds preferentially to the receptor $p75^{NTR}$, elicits neuronal apoptosis [38-40] and facilitates long-term depression (LTD) in the hippocampus [41,42].

Consistent with previous studies [43,44], the apoptotic signaling through $p75^{NTR}$ requires prolonged activation of JNKs [45,46]. The JNKs are proteins that increase apoptosis and neuroinflammation [47-49] by activation of caspase-3 that induces the cleavage of PARP and the decrease of Bcl-2 family, causing cellular disequilibrium and death [4,5].

In the present study, old control rats had an increase in the hippocampal proBDNF levels, suggesting an increase in proBDNF/$p75^{NTR}$ signaling, which could activate neuroinflammatory and apoptotic pathways through the increase of p-JNK/JNK, cleaved caspase 3/caspase 3, cleaved PARP/PARP ratios and a decrease in the levels of the anti-apoptotic Bcl-2 protein. The levels of these apoptotic marker proteins were modulated in the hippocampus of old rats submitted to swimming exercise and supplemented with a diet containing $(PhSe)_2$, supporting the hypothesis that this combined treatment reduced apoptosis in the hippocampus of old rats.

Although the aerobic exercise protocol employed in this study may rejuvenate cognition and neurogenesis in aging rats by modulating inflammatory and neurogenic signaling pathways, the observed benefits may also be due to a diet supplemented with $(PhSe)_2$ which was associated to the aerobic exercise protocol. Besides that, swimming exercise and a $(PhSe)_2$ supplemented diet beneficially affect a number of biological processes in aged rats that include the reduction in serum levels of pro-inflammatory cytokines [17], the modulation of neuroprotective signaling pathways in the hypothalamus [50] and of liver metabolic dysfunction characteristic of aging [51].

Regarding isolated therapy, a diet supplemented with $(PhSe)_2$ was not effective in modulating the levels of protein markers of neuropretection, mBDNF, pPKc/PKc pERK/ERK, NeuN, GFAP and cleaved caspase/procaspase, in the hippocampus of old rats.

Based on the results presented in this study it is not possible to firm that swimming exercise and a dietary supplementation with $(PhSe)_2$ ameliorated memory of old rats [11] by modulating the levels of proteins studied here but the results indicate that the effect on these proteins positively influence the results found in memory tests.

**Acknowledgements**

We gratefully acknowledge UFSM, CAPES, FAPERGS (# 2239-2551/14) and CNPq (#441405/2014-2) for the financial support. G. Z. and C.W. N. are recipient of CNPq fellowships.

**Conflict of interest statement**

The authors declare that there is no conflict of interests in the present study.

**References**

1. Hedden T, Gabrieli JD (2004) Insights into the ageing mind: a view from cognitive neuroscience. Nat Rev Neurosci 5 (2):87-96. doi:10.1038/nrn1323
2. Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. Physiol Rev 85 (2):523-569. doi:10.1152/physrev.00055.2003
3. Lu B, Nagappan G, Lu Y (2014) BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. Handb Exp Pharmacol 220:223-250. doi:10.1007/978-3-642-45106-5_9
4. Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C (2002) The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. Ann N Y Acad Sci 959:93-107
5. Kim SH, Ahn KS, Jeong SJ, Kwon TR, Jung JH, Yun SM, Han I, Lee SG, Kim DK, Kang M, Chen CY, Lee JW (2011) Janus activated kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 pathway mediates icariside II-induced apoptosis in U266 multiple myeloma cells. Eur J Pharmacol 654 (1):10-16. doi:10.1016/j.ejphar.2010.11.032
6. Barrientos RM, Kitt MM, Watkins LR, Maier SF (2015) Neuroinflammation in the normal aging hippocampus. Neuroscience 309:84-99. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.03.007

7. Ojo JO, Rezaie P, Gabbott PL, Stewart MG (2015) Impact of age-related neuroglial cell responses on hippocampal deterioration. Front Aging Neurosci 7:57. doi:10.3389/fnagi.2015.00057
8. Dhanasekaran DN, Reddy EP (2008) JNK signaling in apoptosis. Oncogene 27 (48):6245-6251. doi:10.1038/onc.2008.301
9. 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 (5):357-365. doi:10.1016/j.exger.2010.02.005
10. Kobilo T, Liu QR, Gandhi K, Mughal M, Shaham Y, van Praag H (2011) Running is the neurogenic and neurotrophic stimulus in environmental enrichment. Learn Mem 18 (9):605-609. doi:10.1101/lm.2283011
11. 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. doi:10.1007/s11357-014-9666-8
12. Everitt AV, Hilmer SN, Brand-Miller JC, Jamieson HA, Truswell AS, Sharma AP, Mason RS, Morris BJ, Le Couteur DG (2006) Dietary approaches that delay age-related diseases. Clin Interv Aging 1 (1):11-31
13. Hatfield DL, Gladyshev VN (2002) How selenium has altered our understanding of the genetic code. Mol Cell Biol 22 (11):3565-3576
14. 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. doi:10.1016/j.mad.2013.12.007
15. Rosa RM, Flores DG, Appelt HR, Braga AL, Henriques JA, Roesler R (2003) Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. Neurosci Lett 341 (3):217-220
16. Leite MR, Marcondes Sari MH, de Freitas ML, Oliveira LP, Dalmolin L, Brandao R, Zeni G (2014) Caffeine and diphenyl diselenide improve long-term memory impaired in middle-aged rats. Exp Gerontol 53:67-73. doi:10.1016/j.exger.2014.03.008
17. 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 (1):119-123. doi:10.1016/j.cyto.2014.09.006
18. Paulmier C (1986) Selenoorganic functional groups. In: Paulmier C (ed) Selenium reagents and intermediates in organic synthesis. 1 edn. Pergamon Press, Oxford, pp 25-51
19. de Bem AF, Portella Rde L, Colpo E, Duarte MM, Frediane A, Taube PS, Nogueira CW, Farina M, da Silva EL, Teixeira Rocha JB (2009) Diphenyl diselenide decreases serum levels of total cholesterol and tissue oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. Basic Clin Pharmacol Toxicol 105 (1):17-23. doi:10.1111/j.1742-7843.2009.00414.x
20. Ravi Kiran T, Subramanyam MVV, 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. Comparative Biochemistry and Physiology 137:187-196
21. Farooqui T, Farooqui AA (2009) Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. Mech Ageing Dev 130 (4):203-215. doi:10.1016/j.mad.2008.11.006
22. Glorioso C, Sibille E (2011) Between destiny and disease: genetics and molecular pathways of human central nervous system aging. Prog Neurobiol 93 (2):165-181. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.11.006

23. Lista I, Sorrentino G (2010) Biological mechanisms of physical activity in preventing cognitive decline. Cell Mol Neurobiol 30 (4):493-503. doi:10.1007/s10571-009-9488-x
24. von Bernhardi R, Eugenin-von Bernhardi L, Eugenin J (2015) Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. Front Aging Neurosci 7:124. doi:10.3389/fnagi.2015.00124
25. Wojtera M, Sikorska B, Sobow T, Liberski PP (2005) Microglial cells in neurodegenerative disorders. Folia Neuropathol 43 (4):311-321
26. Liu B, Hong JS (2003) Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. J Pharmacol Exp Ther 304 (1):1-7. doi:10.1124/jpet.102.035048
27. Blasko I, Stampfer-Kountchev M, Robatscher P, Veerhuis R, Eikelenboom P, 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 (4):169-176. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00101.x
28. Burda JE, Sofroniew MV (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. Neuron 81 (2):229-248. doi:10.1016/j.neuron.2013.12.034
29. Blackwell TS, Christman JW (1997) The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. Am J Respir Cell Mol Biol 17 (1):3-9. doi:10.1165/ajrcmb.17.1.f132
30. Bekinschtein P, Cammarota M, Igaz LM, Bevilaqua LR, Izquierdo I, Medina JH (2007) Persistence of long-term memory storage requires a late protein synthesis- and BDNF-dependent phase in the hippocampus. Neuron 53 (2):261-277. doi:10.1016/j.neuron.2006.11.025
31. Barnes P, Thomas KL (2008) Proteolysis of proBDNF is a key regulator in the formation of memory. PLoS One 3 (9):e3248. doi:10.1371/journal.pone.0003248
32. Greenberg ME, Xu B, Lu B, Hempstead BL (2009) New insights in the biology of BDNF synthesis and release: implications in CNS function. J Neurosci 29 (41):12764-12767. doi:10.1523/JNEUROSCI.3566-09.2009
33. von Bohlen und Halbach O (2010) Involvement of BDNF in age-dependent alterations in the hippocampus. Front Aging Neurosci 2. doi:10.3389/fnagi.2010.00036
34. Lonze BE, Ginty DD (2002) Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. Neuron 35 (4):605-623
35. Shaywitz AJ, Greenberg ME (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. Annu Rev Biochem 68:821-861. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.821
36. Brennan AR, Yuan P, Dickstein DL, Rocher AB, Hof PR, Manji H, Arnsten AF (2009) Protein kinase C activity is associated with prefrontal cortical decline in aging. Neurobiol Aging 30 (5):782-792. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.020
37. Van der Zee EA, Palm IF, O'Connor M, Maizels ET, Hunzicker-Dunn M, Disterhoft JF (2004) Aging-related alterations in the distribution of Ca(2+)-dependent PKC isoforms in rabbit hippocampus. Hippocampus 14 (7):849-860. doi:10.1002/hipo.20000
38. Friedman WJ (2010) Proneurotrophins, seizures, and neuronal apoptosis. Neuroscientist 16 (3):244-252. doi:10.1177/1073858409349903
39. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, Kermani P, Torkin R, Chen ZY, Lee FS, Kraemer RT, Nykjaer A, Hempstead BL (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. J Neurosci 25 (22):5455-5463. doi:10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005
40. Volosin M, Song W, Almeida RD, Kaplan DR, Hempstead BL, Friedman WJ (2006) Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. J Neurosci 26 (29):7756-7766. doi:10.1523/JNEUROSCI.1560-06.2006

41. Rosch H, Schweigreiter R, Bonhoeffer T, Barde YA, Korte M (2005) The neurotrophin receptor p75NTR modulates long-term depression and regulates the expression of AMPA receptor subunits in the hippocampus. Proc Natl Acad Sci U S A 102 (20):7362-7367. doi:10.1073/pnas.0502460102
42. Woo NH, Teng HK, Siao CJ, Chiaruttini C, Pang PT, Milner TA, Hempstead BL, Lu B (2005) Activation of p75NTR by proBDNF facilitates hippocampal long-term depression. Nat Neurosci 8 (8):1069-1077. doi:10.1038/nn1510
43. Meissner N, Radke J, Hedges JF, White M, Behnke M, Bertolino S, Abrahamsen M, Jutila MA (2003) Serial analysis of gene expression in circulating gamma delta T cell subsets defines distinct immunoregulatory phenotypes and unexpected gene expression profiles. J Immunol 170 (1):356-364
44. Roose JP, Diehn M, Tomlinson MG, Lin J, Alizadeh AA, Botstein D, Brown PO, Weiss A (2003) T cell receptor-independent basal signaling via Erk and Abl kinases suppresses RAG gene expression. PLoS Biol 1 (2):E53. doi:10.1371/journal.pbio.0000053
45. Casaccia-Bonnefil P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV (1996) Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. Nature 383 (6602):716-719. doi:10.1038/383716a0
46. Friedman WJ (2000) Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. J Neurosci 20 (17):6340-6346
47. Chen F, Beezhold K, Castranova V (2009) JNK1, a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. Biochim Biophys Acta 1796 (2):242-251. doi:10.1016/j.bbcan.2009.06.005
48. Wang Y, Cai J, Zeng X, Chen Y, Yan W, Ouyang Y, Xiao D, Zeng Z, Huang L, Liu A (2015) Downregulation of toll-like receptor 4 induces suppressive effects on hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma via ERK1/2 signaling. BMC Cancer 15:821. doi:10.1186/s12885-015-1866-9
49. Bogoyevitch MA, Kobe B (2006) Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. Microbiol Mol Biol Rev 70 (4):1061-1095. doi:10.1128/MMBR.00025-06
50. Leite MR, Cechella JL, Pinton S, Nogueira CW, Zeni G (2016) A diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise promote neuroprotection, reduced cell apoptosis and glial cell activation in the hypothalamus of old rats. Exp Gerontol 82:1-7. doi:10.1016/j.exger.2016.05.006
51. Heck SO, Fulco BdC, Quines CB, Oliveira CS, Leite MR, Cechella JL, Nogueira CW (2016) Combined therapy with swimming exercise and a diet supplemented with diphenyl diselenide is effective against age-related changes in the hepatic metabolism of rats. J Cell Biochem

**Legends of figures**

**Figure 1**. Effect of a diet supplemented with 1 ppm of $(PhSe)_2$ and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on mBDNF levels (A), p-PKc/PKc ratio (B), p-ERK/ERK ratio (C) and NeuN levels (D) in the hippocampus of old male rats (27 month-old). Values are expressed as the mean ± SEM of six animals per group. $^{*}p< 0.05$ as compared with the old control group, $^{\#}p< 0.05$ as compared with the adult group.

**Figure 2**. Effect of a diet supplemented with 1 ppm of $(PhSe)_2$ and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on the levels of proBDNF (A), Iba-1 (B), and GFAP (C) in the hippocampus of old male rats (27 month-old). Values are expressed as the mean ± SEM of six animals per group. $^{*}p< 0.05$ as compared with the old control group, $^{\#}p< 0.05$ as compared with the adult group, $^{\$}p< 0.05$ as compared with the $(PhSe)_2$ group.

**Figure 3**. Effect of a diet supplemented with 1 ppm of $(PhSe)_2$and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on the fluorescence density of GFAP in the dentate gyrus in hippocampus of old male rats (27 month-old). Values are expressed as the mean ± SEM of six animals per group. #p< 0.05 as compared with the $(PhSe)_2$group, $^{*}p< 0.05$ as compared with the old control group. (A) Fluorescence density quantified; (B) adult control; (C) old control; (D) $(PhSe)_2$; (E) exercise and (F) exercise plus $(PhSe)_2$.

**Figure 4**. Effect of a diet supplemented with 1 ppm of $(PhSe)_2$ and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on the ratios of p-JNK/JNK (A), Bcl2 (B), cleaved caspase3/procaspase 3 (C) and cleaved PARP/full length PARP (D) in the hippocampus of old male rats (27 month-old). Values are expressed as the mean ± SEM of five at six animals per group$^{*}p< 0.05$ as compared with the old control group, $^{\#}p< 0.05$ as compared with the adult group.

**Figure 5**. Representative qualitative Western blotting analysis, figure shows a representative quantification of the proteins immunocontent normalized to GAPDH protein.

**Figure 6.** Representative qualitative Western blotting analysis, figure shows a representative quantification of the proteins immunocontent normalized to GAPDH protein.

Figure Click here to download Figure Figures.docx

**Figure 1.**

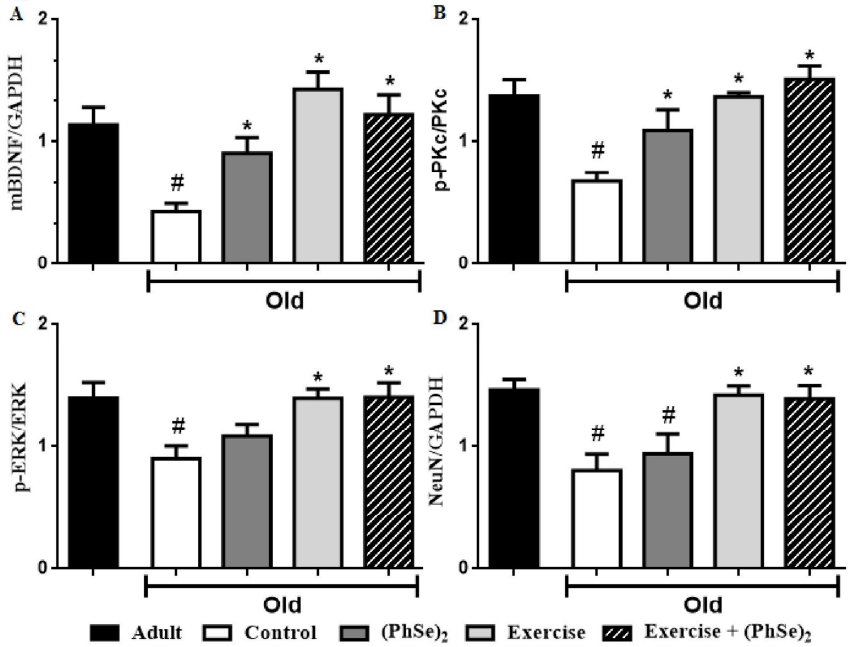



**Figure 1**.Effect of a diet supplemented with 1 ppm of $(PhSe)_2$and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on mBDNF levels (A), p-PKc/PKcratio (B), p-ERK/ERK ratio (C) and NeuN levels (D) in hippocampus of old male rats (27 month-old). Values are expressed as the mean ± SEM of six animals per group. *$p< 0.05$ as compared with the old control group, $^{\#}p< 0.05$ as compared with the adult group.

**Figure 2.**

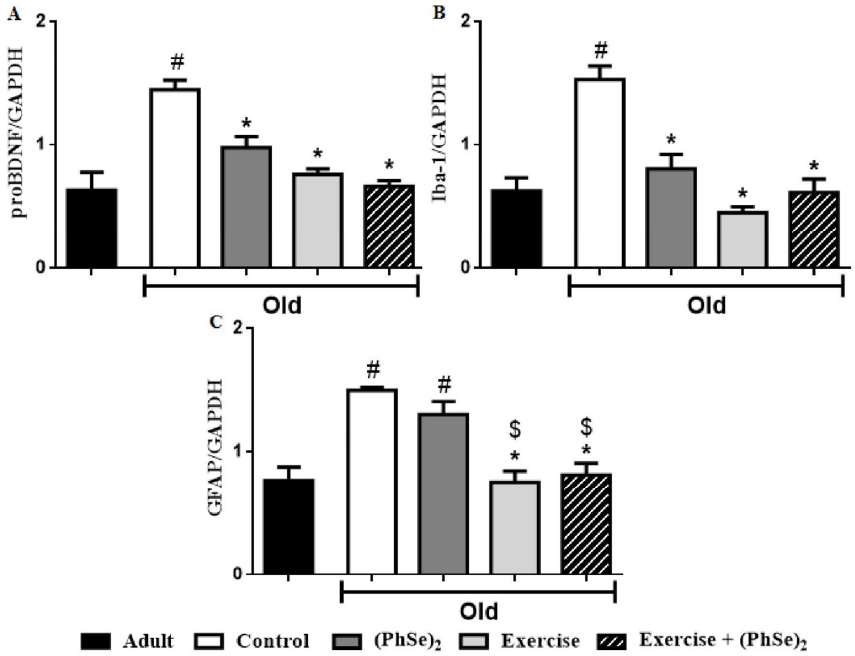



**Figure 2**.Effect of a diet supplemented with 1 ppm of $(PhSe)_2$ and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on the levels of proBDNF (A), Iba-1 (B), and GFAP (C) in hippocampus of old male rats (27 month-old). Values are expressed as the mean ± SEM of six animals per group. *$p< 0.05$ as compared with the old control group, $^{\#}p< 0.05$ as compared with the adult group, $^{\$}p< 0.05$ as compared with the $(PhSe)_2$ group.

**Figure 3.**

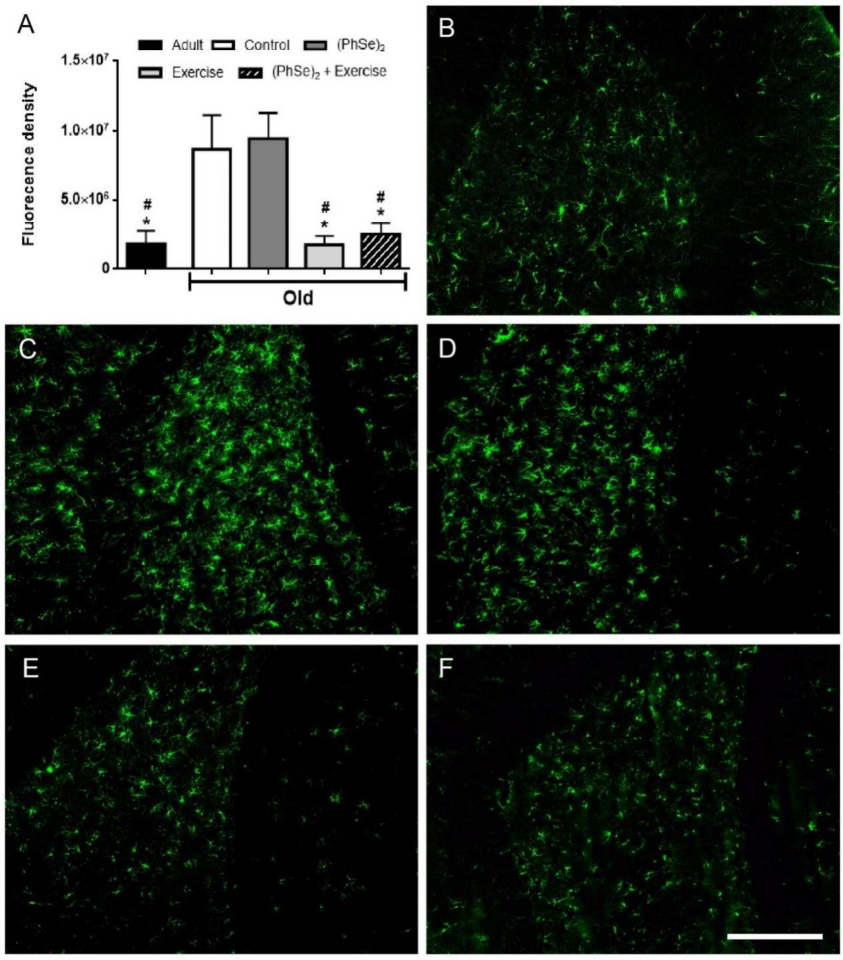



**Figure 3**.Effect of a diet supplemented with 1 ppm of$(PhSe)_2$ and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on the fluorescence density of GFAP in the dentate gyrus in hippocampus of old male rats (27 month-old). Values are expressed as the mean ± SEM of six animals per group. #p< 0.05 as compared with the $(PhSe)_2$group, *p< 0.05 as compared with the old control group. (A) Fluorescence density quantified; (B) adult control; (C) old control; (D) $(PhSe)_2$; (E) exercise and (F) exercise plus $(PhSe)_2$.

**Figure 4.**

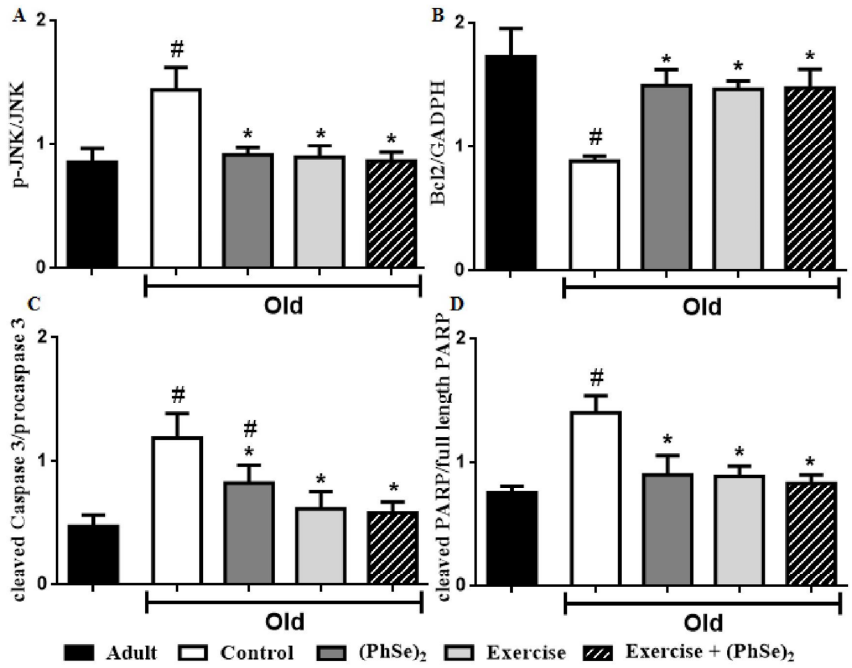



**Figure 4**.Effect of a diet supplemented with 1 ppm of $(PhSe)_2$ and swimming exercise (1% of body weight, 20 min per day for 4 weeks) on the ratios of p-JNK/JNK (A), Bcl2 (B), cleaved caspase3/procaspase 3 (C), and cleaved PARP/full length PARP (D) in hippocampus of old male rats (27 month-old). Values are expressed as the mean ± SEM of five at six animals per group. *p< 0.05 as compared with the old control group, #p< 0.05 as compared with the adult group.

**Figure 5.**

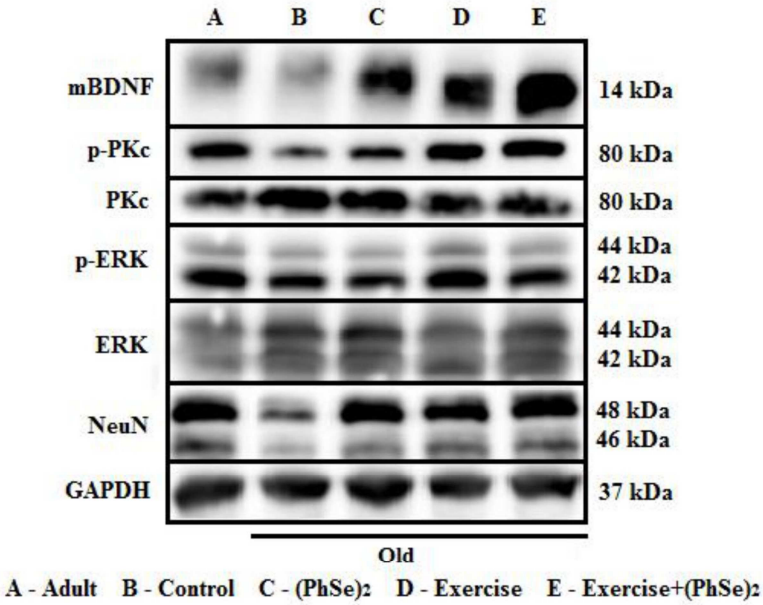



**Figure 5**. Representative qualitative Western blotting analysis, figure shows a representative quantification of the proteins immunocontent normalized to GAPDH protein.

**Figure 6.**

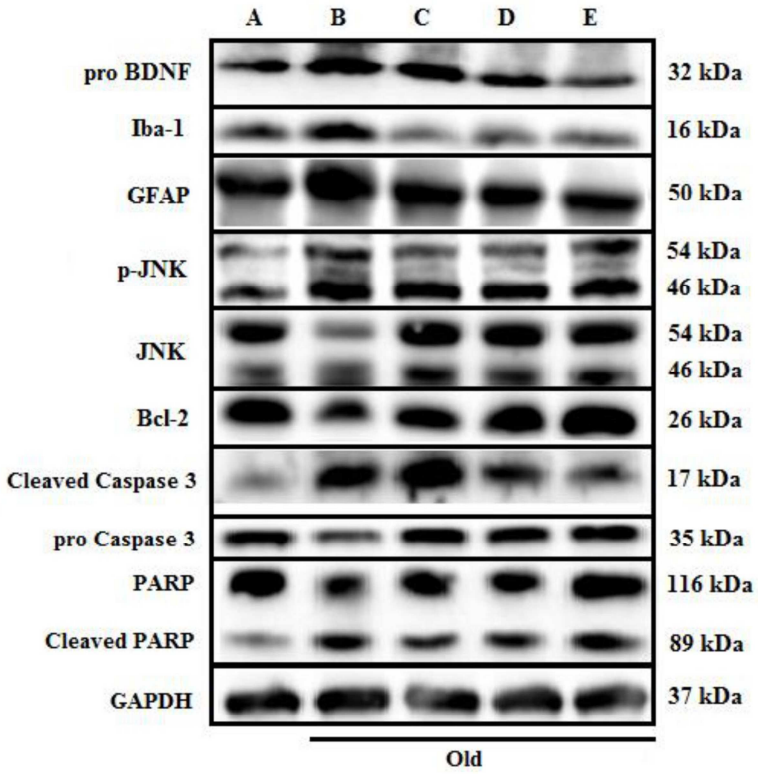



**Figure 6.** Representative qualitative Western blotting analysis, figure shows a representative quantification of the proteins immunocontent normalized to GAPDH protein.

# 4. DISCUSSÃO

O envelhecimento pode ser considerado como um evento sistêmico, uma vez que não ocorre de maneira isolada e direcionada, alterando funcionalmente tecidos em todo o corpo e com diferentes níveis de resistência e sensibilidade (LOPEZ-OTIN et al., 2013; RANDO, 2006). Nesse sentido, evidências sugerem que o SNC é particularmente vulnerável aos efeitos do envelhecimento (MATTSON e MAGNUS, 2006), demonstrando uma perda gradual da capacidade de adaptação física e funcional a novas experiências advindas da idade (MAHNCKE et al., 2006). O processo de envelhecimento modifica múltiplos sistemas biológicos, sendo o tecido cerebral particularmente afetado pela degeneração associada à idade. Algumas alterações morfológicas cerebrais estão intimamente relacionadas com o envelhecimento, tais como atrofia dos neurônios das regiões do córtex cerebral e do hipocampo, diminuição do número de sinapses e de alguns tipos de receptores, acúmulo de produtos de oxidação e aumento da astrogliose (HAUG et al., 1984; MORRISON e HOF, 1997; SIEGEL GJ., 1999). A necessidade do entendimento dos mecanismos pelos quais o exercício físico e os compostos orgânicos de Se exercem seus efeitos benéficos sobre os processos cognitivos, torna-se cada vez mais importante uma vez que na atualidade o exercício físico se encontra indissociável dos conceitos de saúde e de qualidade de vida, principalmente no envelhecimento. Bem como o número de trabalhos descrevendo as mais distintas atividades farmacológicas do $(PhSe)_2$, o que aumenta o interesse pelo estudo dos efeitos benéficos deste 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; LEITE et al., 2016).

Os resultados apresentados nesta tese demonstram o grande potencial do $(PhSe)_2$ e do exercício de natação em melhorar os danos cognitivos e de reduzir a apoptose hipocampal ocasionada pelo envelhecimento, além de, aumentar a expressão de proteínas relacionadas com a neuroplasticidade e a neuroproteção.

O exercício físico e o Se tem se mostrado componentes essenciais para os processos cognitivos através do aumento do número de novas células hipocampais, facilitação da

recuperação de danos cerebrais e melhora da função cognitiva e do desempenho em testes de aprendizagem e memória (AKBARALY et al., 2007; JOHANSSON e OHLSSON, 1996; KEMPERMANN et al., 2002; SMORGON et al., 2004; VAN DER BORGHT et al., 2007; VAN PRAAG et al., 1999a; VAN PRAAG et al., 1999b). Estudos utilizando compostos orgânicos de selênio, especificamente o $(PhSe)_2$ já demonstraram propiedades benéficas deste composto no desempenho cognitivo em roedores, através dos testes de reconhecimento do objeto (ROSA et al., 2003), no teste Y-maze e no teste do Morris water maze (SOUZA et al., 2010; STANGHERLIN et al., 2008), corroborando com os resultados do **artigo 1** desta tese, em que, os animais velhos apresentaram um déficit cognitvo demonstrado nos testes comportamentais e o exercício de natação, o $(PhSe)_2$ e a associação entre os dois foram efetivos em reverter este quadro ocasionado pelo envelhecimento.

Sabe-se que o envelhecimento no SNC resulta na diminuição da capacidade regenerativa (RANDO, 2006) e na manutenção das funções sinápticas e cognitivas (Morrison &Baxter 2012). Esta influência prejudicial do envelhecimento no SNC é particularmente preocupante quando se considera o seu papel na homeostase global. O envelhecimento cerebral normal, bem como o curso de doenças neurodegenerativas, são caracteristicamente marcados pela perda da plasticidade sináptica. Muitos estudos apontam que fatores tróficos são importantes mediadores moleculares dessa plasticidade estrutural e funcional, sendo capazes de auxiliar na proteção neuronal (ARANCIO e CHAO, 2007; LYNCH, G. et al., 2007; TANAKA et al., 2008). A plasticidade sináptica é a propriedade que permite a um neurônio engajar sua atividade em mudanças funcionais e estruturais durante uma sinapse. Uma das vias mais importantes na aquisição do aprendizado e no processamento de novas memórias é a via do BDNF. O BDNF é uma pequena proteína pertencente à família de fatores de crescimento neurotrofinas (MURER; YAN; RAISMAN-VOZARI, 2001). O BDNF é sintetizado inicialmente na forma de pro-BDNF, que posteriormente será clivado pela ação da enzima plasmina, dando origem ao mBDNF (YANG et al., 2009).

A sinalização pelo BDNF é mediada através de duas classes de receptores de membrana celular que se diferem pela via intracelular as quais ativam: receptores cinase B relacionados à tropomiosina – TrkB, e o receptor comum a todas a neurotrofinas $p75^{NTR}$ (CUNHA et al., 2010). Neste trabalho nós observamos uma diminuição no conteúdo proteico de mBDNF e um aumento no conteúdo de proBDNF no hipocampo de ratos Wistar velhos levando a apoptose e ao déficit cognitivo corroborando com outros estudos que demonstraram que um aumento na ligação do proBDNF ao receptor $p75^{NTR}$ induz retração dos dendritos, LTD, apoptose e déficit na memória e no aprendizado (AREVALO e WU, 2006; KRAMER et al.,

2006; POO, 2001; VON BOHLEN e HALBACH, 2010; ZHANG e PARDRIDGE, 2001). Como demostrado no **manuscrito 1**, o $(PhSe)_2$, o exercício de natação e a associação entre os dois foram capazes de aumentar os níveis de mBDNF no hipocampo de ratos velhos. Estudos anteriores demonstram uma melhora no desempenho cognitivo após a prática de exercício físico forçado ou voluntário, agudo e crônico, associado a um aumento nos níveis de BDNF em roedores (ALOMARI et al., 2013; BERCHTOLD et al., 2010; BERCHTOLD et al., 2005; GOMEZ-PINILLA et al., 2012) e em humanos (RASMUSSEN et al., 2009; SEIFERT et al., 2010). Ademais, foi observada uma elevação nos níveis de BDNF com o aumento da *performance* no exercício (CORREIA et al., 2011). Os mecanismos pelos quais o $(PhSe)_2$ age na modulação da plasticidade sináptica no hipocampo em roedores velhos, proporcionando melhorias na função cognitiva, bem como na memória e aprendizado e diminuição nos processos apoptóticos, ainda não são bem definidos.

A ligação do mBDNF ao receptor TrkB induz a sua dimerização e a autofosforilação nos resíduos de tirosina na sua porção intracelular, com subsequente ativação intracelular de uma ou mais cascatas de sinalização que compreendem a via da PI3K, PLCγ e a ERK1/2 (BEKINSCHTEIN et al., 2008; CUNHA et al., 2010). Sendo a cascata das MAPKs umas das maiores ativadoras/sinalizadoras dos receptores Trk (CLARKE e BARRES, 2013; RAGE et al., 2007). Evidências crescentes mostram que a via de sinalização das MAPKs e seus reguladores "*upstream*" e "*downstream*" tem um papel fundamental em muitos processos indispensáveis para o desenvolvimento do SNC (CHENG et al., 2013; JEANNETEAU et al., 2010; QU et al., 2013). Assim, possíveis alterações na via de sinalização das MAPKs podem ser responsáveis por alterar o desenvolvimento neural (PUCILOWSKA et al., 2012). A enzima PI3K está envolvida na ativação da cascata de sinalização intracelular de Akt. A Akt é uma proteína cinase específica de serina/treonina cuja forma ativa proporciona um controle no crescimento e proliferação celular, bem como um "sinal de sobrevivência", protegendo as células da apoptose (LUO et al., 2003). A Akt ativa fatores de transcrição de genes envolvidos na sobrevivência neuronal, através da fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc - CREB (VAN DER HEIDE et al., 2006) e também inibindo proteínas pró-apoptóticas como a GSK3ß e caspases (MIYAWAKI et al., 2009). Os efeitos do exercício e de uma dieta suplementada com $(PhSe)_2$ de melhorar a memória nos testes de reconhecimento de objeto em ratos Wistar velhos mostrados no **artigo 1** desta tese, foram acompanhados por um aumento na fosforilação de CREB, porém apenas o grupo exercitado aumentou a fosforilação de Akt, demonstrando que de alguma outra forma, a dieta suplementada com o $(PhSe)_2$ bloqueou o efeito do exercício em fosforilar a Akt. Reforçando os resultados obtidos

no **artigo 1,** estudos demonstraram que uma diminuição nos níveis de p-CREB está associada com danos na memória e diminuição da plasticidade hipocampal induzidos pelo envelhecimento (BRIGHTWELL et al., 2007; MORRIS e GOLD, 2012). Os efeitos do exercício no aumento da fosforilação de p-CREB e p-Akt já são bem reportados na literatura (AGUIAR et al., 2011; CHEN, M. J. e RUSSO-NEUSTADT, 2009; KIM, S. E. et al., 2013; KWON et al., 2013; SUIJO et al., 2013).

Estudos em modelos animais têm mostrado que eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória incluem também um aumento na atividade de proteínas cinases, como as proteino-cinase G, C e A (PKG, PKC e PKA), proteínas cinases dependente de cálcio-calmodulina (CaMKII e CaMKIV) com consequente fosforilação do CREB e vias relacionadas a PLCγ (CAMMAROTA et al., 2000; DUNNING e DURING, 2003; IZQUIERDO, I. e MEDINA, 1997; IZQUIERDO, L. A. et al., 2000; MCGAUGH e IZQUIERDO, 2000; MEDINA et al., 2008). Os resultados obtidos no **manuscrito 1** mostram uma diminuição na razão p-PKC/PKC nos ratos velhos e uma reversão pela dieta suplementada com o $(PhSe)_2$, pelo exercício de natação e também pela associação dos dois. O que corrobora com um estudo que demostrou um aumento na expressão de PKC causado pelo exercício (MOLTENI et al., 2002), porém quanto aos efeitos do $(PhSe)_2$ nesta via de sinalização, esta é a primeira evidência cientifica de que este composto modula a razão p-PKC/PKC no hipocampo de ratos velhos. Ampliando está hipótese, pode-se sugerir que a ativação desta via esteja envolvida na melhora da memória nos ratos velhos tratados com o $(PhSe)_2$ demonstrada no artigo 1 desta tese.

Outra cascata de sinalização da família das MAPKs, que está envolvida nas vias sinalizadas pelo mBDNF/TrkB, é a cascata das ERKs. As proteínas ERK1/2 estão envolvidas em respostas celulares a fatores de crescimento e outros mitógenos, exercendo ações regulatórias sobre mecanismos de proliferação e diferenciação (THOMAS e HUGANIR, 2004). As ERKs também participam de processos cognitivos e da plasticidade sináptica hipocampal (SWEATT, 2004). ERK1/2 são translocadas do citosol para o núcleo, onde via RSK (ribossomal 6 cinase) ativam fatores de transcrição como CREB, regulando a transcrição gênica (Kim &Choi, 2010). Os resultados obtidos no **manuscrito 1** desta tese demonstraram uma diminuição na fosforilação de ERK no hipocampo de ratos Wistar com o envelhecimento e um aumento na razão de p-ERK/ERK pelo exercício de natação e de sua associação com o $(PhSe)_2$, corroborando com resultados já descritos na literatura (RAGE et al., 2007; SEGAL e GREENBERG, 1996). Somente a dieta suplementada com o $(PhSe)_2$ não foi capaz de aumentar a fosforilação de ERK.

MAPK/ERK, PI3K e PLCγ são vias de sinalização intracelulares comumente ativadas pelo estímulo do aprendizado através da sinalização de mBDNF/TrkB que são cruciais para desencadear os eventos celulares e moleculares que determinarão a consolidação da memória (BRAMHAM e MESSAOUDI, 2005; KAPLAN e MILLER, 2000; LU et al., 2008; YANO e CHAO, 2000). Desta forma, nossos resultados estão de acordo com a literatura que demonstra papel crucial de sinalização de mBDNF/TrkB na plasticidade sináptica e na consolidação da memória (SHEN et al., 2001; SUZUKI et al., 2011; VAYNMAN et al., 2004).

Além destes estudos focados na via mBDNF/TrkB, muitos pesquisadores têm direcionado suas pesquisas para a expressão de genes envolvidos com os mecanismos de morte celular por apoptose, através da ligação do proBDNF ao receptor $p75^{NTR}$. O proBDNF se liga ao receptor $p75^{NTR}$ podendo levar à apoptose e a ativação microglial, principalmente, através da cascata de reações ativada pela MAPKs JNK e $p38^{MAPK}$ ou pelo NF-κB (CUNHA et al., 2010). A JNK e a $p38^{MAPK}$, também conhecidas como proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs), são proteínas ativadas por citocinas e insultos citotóxicos, estando freqüentemente relacionadas ao estresse, a morte celular e aos processos inflamatórios (COWAN e STOREY, 2003; MIELKE e HERDEGEN, 2000). Tem sido demonstrado que genes que participam diretamente deste processo apresentam expressão alterada no hipocampo. Tais genes agem na via apoptótica extrínseca ou intrínseca (BROUNS e DE DEYN, 2009; DOYLE et al., 2008; HENSHALL et al., 2001; HENSHALL e SIMON, 2005). Nesta última, destacam-se as caspases efetoras (caspases 3 e 6), famílias das proteínas bcl-2 pró-apoptóticas (bad, bax, bim, bid) e antiapoptóticas (bcl-2, bcl-x, bcl-w). Os resultados obtidos no **manuscrito 1** desta tese, revelaram um aumento na via de sinalização pró-apoptótica com o envelhecimento, através de um aumento da expressão proteica de proBDNF, consequentemente em um aumento na fosforilação de JNK e também em um aumento na clivagem de caspase-3 e de PARP, revelando também uma diminuição na via de sinalização antiapoptótica, através da diminuição da Bcl-2. Estes resultados são consistentes com prévios estudos que demosntraram que as JNKs são proteínas SAPKs associadas com a perda de neurônios através da apoptose e da neuroinflamação (BOGOYEVITCH e KOBE, 2006; CHEN, F. et al., 2009; WANG, Y. et al., 2015). Um aumento na via apoptótica intrínseca no encéfalo de ratos velhos, reduz os níveis de Bcl-2 facilitando/aumentando a liberação de citocromo c mitocondrial, ativando a caspase 3 que vai induzir a clivagem da PARP e inibir a capacidade de reparar os danos ao DNA, causando morte e desequilíbrio celular (KIM, S. H. et al., 2011; POLLACK et al., 2002). O composto orgânico $(PhSe)_2$ se mostrou eficiente em diminuir a ativação da via apoptótica ativada pela JNK no hipocampo de ratos velhos, demonstrado no

**manuscrito 1**, através de uma diminuição nos níveis de proBDNF, p-JNK, de caspase 3 e PARP clivadas e de um aumento na Bcl-2, indicando novas evidências dos benefícios neuroprotetores do $(PhSe)_2$ em ratos Wistar de 27 meses de idade, protegendo contra a morte celular e a neuroimflamação.

A morte celular por apoptose é normal durante o envelhecimento, porém sugere-se que o exercício físico seja uma ótima estratégia na prevenção do déficit de memória decorrente do envelhecimento (KIM, S. E. et al., 2010). Estudos realizados com animais comprovaram que o exercício previne a apoptose no hipocampo e facilita a recuperação de danos ao SNC, melhorando o aprendizado e a memória (LEE, H. H. et al., 2006; VAN PRAAG, 2009). Estes dados corroboram com os resultados obtidos nesta tese, de que o exercício de natação e a associação do exercício com uma dieta suplementada com o $(PhSe)_2$ reverteram os danos causados pelo envelhecimento, melhorando a memória e ativando/melhorando as cascatas de sinalização relacionadas à memória e ao aprendizado, além disso, protegendo contra a apoptose hipocampal, através da via da JNK, em ratos Wistar velhos.

As JNKs estão amplamente distribuídas nos tecidos dos mamíferos e apresentam funções biológicas relevantes para o cérebro em desenvolvimento e em processos de neurodegeneração e ativação microglial e astrocitária (WAETZIG e HERDEGEN, 2004). A reatividade microglial associada ao envelhecimento pode contribuir para o dano neuronal assim como para a perda de mecanismos neuroprotetores e neurorregulatórios, podendo resultar em redução das funções cognitivas (BARRIENTOS et al., 2010; JURGENS e JOHNSON, 2012). A microglia consiste nas células de defesa do cérebro, com uma função análoga aos macrófagos. São essenciais para o funcionamento correto do cérebro por estarem envolvidas em alguns processos como: diferenciação neuronal, crescimento axonal, proliferação dos astrócitos e angiogênese. Quando ativadas elas podem exibir atividade neuroprotetora por estarem envolvidas, por exemplo, no reparo tecidual. Em situações que são ativadas em excesso, podem participar da neurodegeneração (podendo ser denominadas como microglia neurotóxica) observada em algumas doenças, pela secreção de citocinas pró-inflamatórias, indução de enzimas pro-inflamatórias (por exemplo, COX-2) e ativação astrocitária (AMOR et al., 2014; GRAEBER et al., 2011; JACOBS e TAVITIAN, 2012; LEITE et al., 2016). Como demonstrado no **manuscrito 1**, os níveis de Iba-1 e GFAP indicaram um aumento na ativação microglial e astrocitária no hipocampo de ratos velhos. Estes resultados corroboram com a hipótese de ativação da cascata de sinalização apoptótica induzida pela ligação do proBDNF ao $p75^{NTR}$ e um aumento nas p-JNKs com, consequente,

aumento na geração de moléculas inflamatórias e oxidativas, levando ao quadro de astrogliose, resultados reforçados pelo análise da GFAP por imunohistoquímica.

A dieta com o $(PhSe)_2$ diminuiu os níveis de Iba-1, possivelmente, contribuindo na diminuição da ativação da via apoptótica e no aumento da via neurogênica, colaborando com a melhora do desempenho dos animais nos testes de memória demonstrada no **artigo** 1, mas não foi capaz de reverter a astrogliose, resultado este que está de acordo com a literatura, de que, uma das características principais da astrogliose é o aumento da expressão de GFAP, mas também pode ser associada com a neurodegeneração (COYLE e SCHWARCZ, 2000; SHAO e MCCARTHY, 1994; TARDY, 2002), podendo refletir na sinaptogênese, na neurotransmissão anormal contribuindo para os danos cognitivos (FERRARI, C.K.B., 2000b; O'CALLAGHAN e JENSEN, 1992; RAJKOWSKA et al., 2002). Acredita-se que as quatro semanas de suplementação com o $(PhSe)_2$ não foram suficientes para diminuir os níveis de GFAP e de aumentar os níveis do marcador de neurônios NeuN no hipocampo de ratos velhos, como mostrado no **manuscrito 1**.

O exercício de natação e a associação dos dois, exercício e dieta suplementada, foram eficazes em diminuir a ativação microglial e a astrogliose e de aumentar os níveis de NeuN. Diversos estudos demonstram que a atividade física é um potente indutor do aumento da neurogênese no giro denteado em animais jovens, adultos e idosos (GOULD et al., 1999; KEMPERMANN et al., 2002; KEMPERMANN et al., 2004; KOHMAN et al., 2012; KRONENBERG et al., 2003; VAN PRAAG et al., 1999a; VAN PRAAG et al., 1999b; VAN PRAAG et al., 2005).

Com base nestes mecanismos propostos, concluí-se que os efeitos benéficos apresentados nesta tese, são mediados por interações entre células do SNC com funções imunes (microglia e astrócitos), neurônios e células precursoras neuronais. Estas interações envolvem a capacidade de resposta de neurônios e células gliais a neurotransmissores, hormônios, neurotrofinas e mediadores inflamatórios. Dessa forma, considera-se que os processos neuroquímicos relacionados ao desenvolvimento do SNC, à neuroplasticidade, à sobrevivência e à morte celular e ao aparecimento de doenças neurodegenerativas podem ser modulados pela atividade dessas vias de sinalização sobre diversas proteínas alvo, como fatores de transcrição, proteínas apoptóticas e produção de fatores neurotróficos. Os dados apresentados nesta tese demonstram o potencial anti-apoptótico e neuroprotetor de uma dieta suplementada com o $(PhSe)_2$ juntamente com a prática de exercício de natação por diversos mecanismos, evidenciando novas propostas de ação deste composto sobre modificações

causadas pelo envelhecimento, estimulando assim novos estudos para um melhor entendimento dos mecanismos de ação no hipocampo de ratos velhos Wistar.

Além dos efeitos evidenciados nesta tese, estudos do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que o exercício de natação e uma dieta suplementada com o $(PhSe)_2$ afetam benéficamente diversos processos biológicos em ratos velhos, tais como a redução dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (LEITE et al., 2015), a modulação de vias de sinalização relacionadas á neuroproteção no hipotálamo (LEITE et al., 2016) e a disfunção metabólica hepática característica do envelhecimento (HECK et al., 2016).

# 5. CONCLUSÃO

Os dados apresentados nesta tese possibilitam concluir que:

- Tanto o composto $(PhSe)_2$ quanto o exercício de natação e a associação dos dois possuem efeitos em prevenir o declínio cognitivo causado pela idade. No entanto, o grupo exercício não melhorou a memória de longa duração, mas foi eficaz em melhorar a memória espacial;
- Os fatores de neuroproteção, proliferação, diferenciação, sobrevivência celular e plasticidade sináptica investigados nesta tese, mBDNF, Akt,PKc, ERK e CREB foram aumentados em hipocampo de ratos velhos pelo exercício, e pela suplementação com $(PhSe)_2$ mais exercício de natação. A suplementação não aumentou os níveis de Akt e ERK;
- A ativação de células gliais (Iba-1 e GFAP) no hipocampo de ratos velhos é considerada uma importante fonte de moléculas neurotóxicas. O exercício de natação e a associação do exercício com a suplementação com o $(PhSe)_2$ diminuiram os níveis de GFAP. No entanto, somente a suplementação com o $(PhSe)_2$ não foi capaz de reverter a astrogliose causada pelo envelhecimento. Porém, a suplementação com $(PhSe)_2$, o exercício de natação e associação dos dois foram eficazes em diminuir os níveis de Iba-1. Além disso, o proBDNF que aumenta a fosforilação da JNK, que tem um papel em ativar genes inflamatórios, também foi diminuída, o que reforça a ideia de uma diminuição da neuroinflamação hipocampal por ação da suplementação com o $(PhSe)_2$, pelo exercício de natação e pela associação destes;
- A combinação da suplementação com o $(PhSe)_2$ e o exercício de natação foi efetiva em reduzir a apoptose de células hipocampais em ratos velhos, uma vez que a razão da caspase 3 clivada/caspase3 e PARP clivada/PARP foram diminuídas. Reforçando o efeito anti-apoptótico do $(PhSe)_2$ e do exercício de natação, os níveis de Bcl2 e NeuN

foram aumentados.

- A redução da neuroinflamação e da via apoptótica pela combinação da suplementação com o $(PhSe)_2$ e exercício de natação, demonstrando seu papel anti-apoptótico em conjunto com os efeitos neuroprotetores, pode ser o mecanismo envolvido na melhora cognitiva de ratos velhos apresentada nesta tese.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


AARSLAND, D. et al. Is physical activity a potential preventive factor for vascular dementia? A systematic review. **Aging Ment Health,** v. 14, n. 4, p. 386-95, May 2010.

AGUIAR, A. S., JR. et al. 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,** v. 132, n. 11-12, p. 560-7, Nov-Dec 2011.

AHLENIUS, H. et al. Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain. **J Neurosci,** v. 29, n. 14, p. 4408-19, Apr 08 2009.

AICARDI, G. et al. Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 101, n. 44, p. 15788-92, Nov 02 2004.

AKBARALY, T. N. et al. Plasma selenium over time and cognitive decline in the elderly. **Epidemiology,** v. 18, n. 1, p. 52-8, Jan 2007.

ALLEN, N. J.; BARRES, B. A. Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. **Curr Opin Neurobiol,** v. 15, n. 5, p. 542-8, Oct 2005.

ALOMARI, M. A. et al. Forced and voluntary exercises equally improve spatial learning and memory and hippocampal BDNF levels. **Behav Brain Res,** v. 247, p. 34-9, Jun 15 2013.

AMOR, S. et al. Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. **Immunology,** v. 142, n. 2, p. 151-66, Jun 2014.

AMREIN, I. et al. Comparing adult hippocampal neurogenesis in mammalian species and orders: influence of chronological age and life history stage. **Eur J Neurosci,** v. 34, n. 6, p. 978-87, Sep 2011.

ANDERSEN, K. et al. Expression of S100A4 combined with reduced E-cadherin expression predicts patient outcome in malignant melanoma. **Mod Pathol,** v. 17, n. 8, p. 990-7, Aug 2004.

ANGEVAREN, M. et al. Physical activity and enhanced fitness to improve cognitive function in older people without known cognitive impairment. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 3, p. CD005381, 2008.

ARANCIO, O.; CHAO, M. V. Neurotrophins, synaptic plasticity and dementia. **Curr Opin Neurobiol,** v. 17, n. 3, p. 325-30, Jun 2007.

AREVALO, J. C.; WU, S. H. Neurotrophin signaling: many exciting surprises! **Cell Mol Life Sci,** v. 63, n. 13, p. 1523-37, Jul 2006.

ARNER, E. S. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. **Biochim Biophys Acta,** v. 1790, n. 6, p. 495-526, Jun 2009.

BARDE, Y. A. et al. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **EMBO J,** v. 1, n. 5, p. 549-53, 1982.

BARRIENTOS, R. M. et al. Memory impairments in healthy aging: Role of aging-induced microglial sensitization. **Aging Dis,** v. 1, n. 3, p. 212-231, Jan 01 2010.

BARROS NETO, T. L. **Exercício, Saúde e Desempenho Físico.** São Paulo: Atheneu, 2007.

BAXTER, M. F.; BAXTER, D. A. **Mecanismos neurais do aprendizado e da memória**. Editora Manole: 2001.

BEKINSCHTEIN, P. et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 105, n. 7, p. 2711-6, Feb 19 2008.

BERCHTOLD, N. C. et al. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. **Neuroscience,** v. 167, n. 3, p. 588-97, May 19 2010.

BERCHTOLD, N. C. et al. Exercise primes a molecular memory for brain-derived neurotrophic factor protein induction in the rat hippocampus. **Neuroscience,** v. 133, n. 3, p. 853-61, 2005.

BILBO, S. D. Early-life infection is a vulnerability factor for aging-related glial alterations and cognitive decline. **Neurobiol Learn Mem,** v. 94, n. 1, p. 57-64, Jul 2010.

BLUM, S. et al. A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. **J Neurosci,** v. 19, n. 9, p. 3535-44, May 01 1999.

BOGOYEVITCH, M. A.; KOBE, B. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. **Microbiol Mol Biol Rev,** v. 70, n. 4, p. 1061-95, Dec 2006.

BORGES, L. P. et al. Protective effect of diphenyl diselenide on acute liver damage induced by 2-nitropropane in rats. **Toxicology,** v. 210, n. 1, p. 1-8, May 15 2005.

BRAMANTI, V. et al. Biomarkers of glial cell proliferation and differentiation in culture. **Front Biosci (Schol Ed),** v. 2, p. 558-70, Jan 01 2010.

BRAMHAM, C. R.; MESSAOUDI, E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. **Prog Neurobiol,** v. 76, n. 2, p. 99-125, Jun 2005.

BRIGHTWELL, J. J. et al. Long-term memory for place learning is facilitated by expression of cAMP response element-binding protein in the dorsal hippocampus. **Learn Mem,** v. 14, n. 3, p. 195-9, Mar 2007.

BRITO, V. B. et al. Diphenyl diselenide and diphenyl ditelluride increase the latency for 4-aminopyridine-induced chemical seizure and prevent death in mice. **Acta Biochim Pol,** v. 56, n. 1, p. 125-34, 2009.

BROUNS, R.; DE DEYN, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. **Clin Neurol Neurosurg,** v. 111, n. 6, p. 483-95, Jul 2009.

BROWN, K. M.; ARTHUR, J. R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. **Public Health Nutr,** v. 4, n. 2B, p. 593-9, Apr 2001.

BUCHANAN, J. B. et al. Cognitive and neuroinflammatory consequences of mild repeated stress are exacerbated in aged mice. **Psychoneuroendocrinology,** v. 33, n. 6, p. 755-65, Jul 2008.

CABEZAS, R. et al. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. **Front Cell Neurosci,** v. 8, p. 211, 2014.

CAMMAROTA, M. et al. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Brain Res Mol Brain Res,** v. 76, n. 1, p. 36-46, Mar 10 2000.

CANCELA, D. O Processo do Envelhecimento. Porto 2007.

CARUSO, C. et al. Aging, longevity, inflammation, and cancer. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1028, p. 1-13, Dec 2004.

CASANOVA SOTOLONGO, P. et al. [Memory. An introduction to the study of the cognitive disorders in normal and pathological aging]. **Rev Neurol,** v. 38, n. 5, p. 469-72, Mar 1-15 2004.

CECHELLA, J. L. et al. Diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise enhance novel object recognition memory in old rats. **Age (Dordr),** v. 36, n. 4, p. 9666, 2014.

CECHETTI, F. et al. Chronic brain hypoperfusion causes early glial activation and neuronal death, and subsequent long-term memory impairment. **Brain Res Bull,** v. 87, n. 1, p. 109-16, Jan 04 2012.

CERBAI, F. et al. The neuron-astrocyte-microglia triad in normal brain ageing and in a model of neuroinflammation in the rat hippocampus. **PLoS One,** v. 7, n. 9, p. e45250, 2012.

CHEN, F. et al. JNK1, a potential therapeutic target for hepatocellular carcinoma. **Biochim Biophys Acta,** v. 1796, n. 2, p. 242-51, Dec 2009.

CHEN, M. J.; RUSSO-NEUSTADT, A. A. Running exercise-induced up-regulation of hippocampal brain-derived neurotrophic factor is CREB-dependent. **Hippocampus,** v. 19, n. 10, p. 962-72, Oct 2009.

CHENG, P. et al. The role of ERK1/2 in the regulation of proliferation and differentiation of astrocytes in developing brain. **Int J Dev Neurosci,** v. 31, n. 8, p. 783-9, Dec 2013.

CLARKE, L. E.; BARRES, B. A. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. **Nat Rev Neurosci,** v. 14, n. 5, p. 311-21, May 2013.

CLEMENTE, E. **Aspectos Biológicos e Geriátricos do Envelhecimento**. 2008.

COELHO, F. G. et al. Physical exercise modulates peripheral levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF): a systematic review of experimental studies in the elderly. **Arch Gerontol Geriatr,** v. 56, n. 1, p. 10-5, Jan-Feb 2013.

COOKSON, M. R.; PENTREATH, V. W. Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. **Toxicol In Vitro,** v. 8, n. 3, p. 351-9, Jun 1994.

CORBIT, K. C. et al. Protein kinase Cdelta mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. **Mol Cell Biol,** v. 19, n. 6, p. 4209-18, Jun 1999.

CORREIA, P. R. et al. Increased basal plasma brain-derived neurotrophic factor levels in sprint runners. **Neuroscience Bulletin,** v. 27, n. 5, p. 325-329, Oct 2011.

COSTA, S. et al. Astroglial permissivity for neuritic outgrowth in neuron-astrocyte cocultures depends on regulation of laminin bioavailability. **Glia,** v. 37, n. 2, p. 105-13, Feb 2002.

COTMAN, C. W.; ENGESSER-CESAR, C. Exercise enhances and protects brain function. **Exerc Sport Sci Rev,** v. 30, n. 2, p. 75-9, Apr 2002.

COWAN, K. J.; STOREY, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. **J Exp Biol,** v. 206, n. Pt 7, p. 1107-15, Apr 2003.

COYLE, J. T.; SCHWARCZ, R. Mind glue: implications of glial cell biology for psychiatry. **Arch Gen Psychiatry,** v. 57, n. 1, p. 90-3, Jan 2000.

CUNHA, C. et al. A simple role for BDNF in learning and memory? **Front Mol Neurosci,** v. 3, p. 1, 2010.

DE FREITAS, A. 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,** v. 79, n. 1, p. 77-84, Apr 6 2009.

DE VARGAS BARBOSA, N. B. et al. Diphenyl diselenide supplementation delays the development of N-nitroso-N-methylurea-induced mammary tumors. **Arch Toxicol,** v. 82, n. 9, p. 655-63, Sep 2008.

DICKSTEIN, D. L. et al. Dendritic spine changes associated with normal aging. **Neuroscience,** v. 251, p. 21-32, Oct 22 2013.

DOYLE, K. P. et al. Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology,** v. 55, n. 3, p. 310-8, Sep 2008.

DRISCOLL, I. et al. Enhanced cell death and learning deficits after a mini-stroke in aged hippocampus. **Neurobiol Aging,** v. 29, n. 12, p. 1847-58, Dec 2008.

DRISCOLL, I.; SUTHERLAND, R. J. The aging hippocampus: navigating between rat and human experiments. **Rev Neurosci,** v. 16, n. 2, p. 87-121, 2005.

DUMONT, E. et al. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. **Anal Bioanal Chem,** v. 385, n. 7, p. 1304-23, Aug 2006.

DUNNING, J.; DURING, M. J. Molecular mechanisms of learning and memory. **Expert Rev Mol Med,** v. 5, n. 25, p. 1-11, Oct 07 2003.

DUNTAS, L. H.; BENVENGA, S. Selenium: an element for life. **Endocrine**, Dec 18 2014.

EDDLESTON, M.; MUCKE, L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience,** v. 54, n. 1, p. 15-36, May 1993.

EICHENBAUM, H. Declarative memory: insights from cognitive neurobiology. **Annu Rev Psychol,** v. 48, p. 547-72, 1997.

EICHENBAUM, H. et al. Further studies of hippocampal representation during odor discrimination learning. **Behav Neurosci,** v. 103, n. 6, p. 1207-16, Dec 1989.

ENGLISH, J. D.; SWEATT, J. D. A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. **J Biol Chem,** v. 272, n. 31, p. 19103-6, Aug 01 1997.

FERNANDEZ, A. M.; TORRES-ALEMAN, I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. **Nat Rev Neurosci,** v. 13, n. 4, p. 225-39, Mar 20 2012.

FERRARI, C. K. B. Free radicals, lipid peroxidation and antioxidants in apoptosis: implications in cancer, cardiovascular and neurological diseases. **Biologia, Bratislava,** v. 55, n. 6, p. 581-590, 2000.

FERRARI, C. K. B. Apoptose: A importância da maquinaria de morte celular no controle e na patogênese das doenças. **Rev Ciênc Med,** v. 9, p. 21-31, 2000b.

FIELDS, R. D.; STEVENS-GRAHAM, B. New insights into neuron-glia communication. **Science,** v. 298, n. 5593, p. 556-62, Oct 18 2002.

FIORE, R. S. et al. Activation of p42 mitogen-activated protein kinase by glutamate receptor stimulation in rat primary cortical cultures. **J Neurochem,** v. 61, n. 5, p. 1626-33, Nov 1993.

FUKUNAGA, K.; MIYAMOTO, E. A working model of CaM kinase II activity in hippocampal long-term potentiation and memory. **Neurosci Res,** v. 38, n. 1, p. 3-17, Sep 2000.

GHISLENI, G. et al. Diphenyl diselenide protects rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation and diminishes inducible nitric oxide synthase immunocontent. **Brain Res,** v. 986, n. 1-2, p. 196-9, Oct 3 2003.

GHISLENI, G. et al. Selenium compounds counteract the stimulation of ecto-nucleotidase activities in rat cultured cerebellar granule cells: putative correlation with neuroprotective effects. **Brain Res,** v. 1221, p. 134-40, Jul 24 2008.

GLASER, V. 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,** v. 390, n. 1-2, p. 1-8, May 2014.

GOMEZ-PINILLA, F. et al. Brain and spinal cord interaction: protective effects of exercise prior to spinal cord injury. **PLoS One,** v. 7, n. 2, p. e32298, 2012.

GONZALEZ, S. et al. Food intake and serum selenium concentration in elderly people. **Ann Nutr Metab,** v. 50, n. 2, p. 126-31, 2006.

GOULD, E. et al. Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. **Trends Cogn Sci,** v. 3, n. 5, p. 186-192, May 1999.

GRAEBER, M. B. et al. Role of microglia in CNS inflammation. **FEBS Lett,** v. 585, n. 23, p. 3798-805, Dec 01 2011.

GROSS, C. G. Coding for visual categories in the human brain. **Nat Neurosci,** v. 3, n. 9, p. 855-6, Sep 2000.

GUYTON, A.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 1997.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans,** v. 35, n. Pt 5, p. 1147-50, Nov 2007.

HAUG, H. et al. The significance of morphometric procedures in the investigation of age changes in cytoarchitectonic structures of human brain. **J Hirnforsch,** v. 25, n. 4, p. 353-74, 1984.

HECK, S. O. et al. Combined therapy with swimming exercise and a diet supplemented with diphenyl diselenide is effective against age-related changes in the hepatic metabolism of rats. **J Cell Biochem**, 2016.

HELDT, S. A. et al. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. **Mol Psychiatry,** v. 12, n. 7, p. 656-70, Jul 2007.

HENSHALL, D. C. et al. Formation of the Apaf-1/cytochrome c complex precedes activation of caspase-9 during seizure-induced neuronal death. **Cell Death Differ,** v. 8, n. 12, p. 1169-81, Dec 2001.

HENSHALL, D. C.; SIMON, R. P. Epilepsy and apoptosis pathways. **J Cereb Blood Flow Metab,** v. 25, n. 12, p. 1557-72, Dec 2005.

HOF, P. R.; MORRISON, J. H. The aging brain: morphomolecular senescence of cortical circuits. **Trends Neurosci,** v. 27, n. 10, p. 607-13, Oct 2004.

HOTTING, K.; RODER, B. Beneficial effects of physical exercise on neuroplasticity and cognition. **Neurosci Biobehav Rev,** v. 37, n. 9 Pt B, p. 2243-57, Nov 2013.

HOYER, S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease. **Eur J Pharmacol,** v. 490, n. 1-3, p. 115-25, Apr 19 2004.

HUANG, E. J.; REICHARDT, L. F. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. **Annu Rev Neurosci,** v. 24, p. 677-736, 2001.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Artmed, 2002.

_____. **Memória**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav Pharmacol,** v. 11, n. 7-8, p. 517-34, Nov 2000.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem,** v. 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997.

IZQUIERDO, L. A. et al. Short- and long-term memory are differentially affected by metabolic inhibitors given into hippocampus and entorhinal cortex. **Neurobiol Learn Mem,** v. 73, n. 2, p. 141-9, Mar 2000.

JACOBS, A. H.; TAVITIAN, B. Noninvasive molecular imaging of neuroinflammation. **J Cereb Blood Flow Metab,** v. 32, n. 7, p. 1393-415, Jul 2012.

JACOBSON, L. et al. Correlation of cellular changes and spatial memory during aging in rats. **Exp Gerontol,** v. 43, n. 10, p. 929-38, Oct 2008.

JEANNETEAU, F. et al. The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates BDNF-induced axon branching. **Nat Neurosci,** v. 13, n. 11, p. 1373-9, Nov 2010.

JI, Y. et al. Cyclic AMP controls BDNF-induced TrkB phosphorylation and dendritic spine formation in mature hippocampal neurons. **Nat Neurosci,** v. 8, n. 2, p. 164-72, Feb 2005.

JOHANSSON, B. B.; OHLSSON, A. L. Environment, social interaction, and physical activity as determinants of functional outcome after cerebral infarction in the rat. **Exp Neurol,** v. 139, n. 2, p. 322-7, Jun 1996.

JURGENS, H. A.; JOHNSON, R. W. Dysregulated neuronal-microglial cross-talk during aging, stress and inflammation. **Exp Neurol,** v. 233, n. 1, p. 40-8, Jan 2012.

KANE, D. J. et al. Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science,** v. 262, n. 5137, p. 1274-7, Nov 19 1993.

KAPLAN, D. R.; MILLER, F. D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. **Curr Opin Neurobiol,** v. 10, n. 3, p. 381-91, Jun 2000.

KELLNER, Y. et al. The BDNF effects on dendritic spines of mature hippocampal neurons depend on neuronal activity. **Front Synaptic Neurosci,** v. 6, p. 5, 2014.

KEMPERMANN, G. et al. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. **Ann Neurol,** v. 52, n. 2, p. 135-43, Aug 2002.

KEMPERMANN, G. et al. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. **Trends Neurosci,** v. 27, n. 8, p. 447-52, Aug 2004.

KETTENMANN, H.; VERKHRATSKY, A. Neuroglia: the 150 years after. **Trends Neurosci,** v. 31, n. 12, p. 653-9, Dec 2008.

KIM, J. J.; DIAMOND, D. M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nat Rev Neurosci,** v. 3, n. 6, p. 453-62, Jun 2002.

KIM, S. E. et al. Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. **Exp Gerontol,** v. 45, n. 5, p. 357-65, May 2010.

KIM, S. E. et al. Treadmill exercise and wheel exercise enhance expressions of neutrophic factors in the hippocampus of lipopolysaccharide-injected rats. **Neurosci Lett,** v. 538, p. 54-9, Mar 22 2013.

KIM, S. H. et al. Janus activated kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 pathway mediates icariside II-induced apoptosis in U266 multiple myeloma cells. **Eur J Pharmacol,** v. 654, n. 1, p. 10-6, Mar 1 2011.

KOHMAN, R. A. et al. Voluntary wheel running enhances contextual but not trace fear conditioning. **Behav Brain Res,** v. 226, n. 1, p. 1-7, Jan 01 2012.

KRAMER, A. F. et al. Exercise, cognition, and the aging brain. **J Appl Physiol,** v. 101, n. 4, p. 1237-42, Oct 2006.

KROES, M. C.; FERNANDEZ, G. Dynamic neural systems enable adaptive, flexible memories. **Neurosci Biobehav Rev,** v. 36, n. 7, p. 1646-66, Aug 2012.

KRONENBERG, G. et al. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. **J Comp Neurol,** v. 467, n. 4, p. 455-63, Dec 22 2003.

KRYUKOV, G. V. et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science,** v. 300, n. 5624, p. 1439-43, May 30 2003.

KWON, D. H. et al. Exercise ameliorates cognition impairment due to restraint stress-induced oxidative insult and reduced BDNF level. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 434, n. 2, p. 245-51, May 3 2013.

LEE, H. H. et al. Maternal swimming during pregnancy enhances short-term memory and neurogenesis in the hippocampus of rat pups. **Brain Dev,** v. 28, n. 3, p. 147-54, Apr 2006.

LEE, S. W. et al. New neurons in an aged brain. **Behav Brain Res,** v. 227, n. 2, p. 497-507, Feb 14 2012.

LEFRANCOIS, T. et al. Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures. **J Neurosci,** v. 17, n. 11, p. 4121-8, Jun 01 1997.

LEITE, M. R. et al. 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,** v. 71, n. 1, p. 119-23, Jan 2015.

LEITE, M. R. et al. A diphenyl diselenide-supplemented diet and swimming exercise promote neuroprotection, reduced cell apoptosis and glial cell activation in the hypothalamus of old rats. **Exp Gerontol,** v. 82, p. 1-7, May 20 2016.

LEITE, M. R. et al. Caffeine and diphenyl diselenide improve long-term memory impaired in middle-aged rats. **Exp Gerontol,** v. 53, p. 67-73, May 2014.

LIU, Y. F. et al. Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. **J Physiol,** v. 587, n. Pt 13, p. 3221-31, Jul 1 2009.

LLEDO, P. M. et al. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. **Nat Rev Neurosci,** v. 7, n. 3, p. 179-93, Mar 2006.

LOPEZ-OTIN, C. et al. The hallmarks of aging. **Cell,** v. 153, n. 6, p. 1194-217, Jun 06 2013.

LU, Y. et al. BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? **Neurobiol Learn Mem,** v. 89, n. 3, p. 312-23, Mar 2008.

LUCHESE, C. et al. Antioxidant effect of diphenyl diselenide on oxidative damage induced by smoke in rats: involvement of glutathione. **Ecotoxicol Environ Saf,** v. 72, n. 1, p. 248-54, Jan 2009.

LUO, H. R. et al. Inositol pyrophosphates mediate chemotaxis in Dictyostelium via pleckstrin homology domain-PtdIns(3,4,5)P3 interactions. **Cell,** v. 114, n. 5, p. 559-72, Sep 05 2003.

LYNCH, A. M. et al. The impact of glial activation in the aging brain. **Aging Dis,** v. 1, n. 3, p. 262-78, Dec 2010.

LYNCH, G. et al. LTP consolidation: substrates, explanatory power, and functional significance. **Neuropharmacology,** v. 52, n. 1, p. 12-23, Jan 2007.

MAHNCKE, H. W. et al. Brain plasticity and functional losses in the aged: scientific bases for a novel intervention. **Prog Brain Res,** v. 157, p. 81-109, 2006.

MARAGAKIS, N. J.; ROTHSTEIN, J. D. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. **Nat Clin Pract Neurol,** v. 2, n. 12, p. 679-89, Dec 2006.

MATSUBARA, M. et al. Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions. **J Biol Chem,** v. 271, n. 35, p. 21108-13, Aug 30 1996.

MATTSON, M. P.; MAGNUS, T. Ageing and neuronal vulnerability. **Nat Rev Neurosci,** v. 7, n. 4, p. 278-94, Apr 2006.

MAZO, G. Z. et al. Atividade Física e o Idoso. In: SULINA (Ed.), 2006.

MCGAUGH, J. L.; IZQUIERDO, I. The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. **Trends Pharmacol Sci,** v. 21, n. 6, p. 208-10, Jun 2000.

MEAD, C.; PENTREATH, V. W. Hypertrophy and increased glial fibrillary acidic protein are coupled to increased protection against cytotoxicity in glioma cell lines. **Toxicol In Vitro,** v. 12, n. 2, p. 141-52, Apr 1998.

MEDINA, J. H. et al. Do memories consolidate to persist or do they persist to consolidate? **Behav Brain Res,** v. 192, n. 1, p. 61-9, Sep 01 2008.

MEIRELLES, M. E. **Atividade Física na Terceira Idade: uma abordagem sistêmica**. Rio de Janeiro: Sprint, 1997.

MELO, M. T. et al. Diphenyl diselenide protects cultured MCF-7 cells against tamoxifen-induced oxidative DNA damage. **Biomed Pharmacother,** v. 67, n. 4, p. 329-35, May 2013.

MEOTTI, F. C. et al. Protective role of aryl and alkyl diselenides on lipid peroxidation. **Environ Res,** v. 94, n. 3, p. 276-82, Mar 2004.

MERAD-BOUDIA, M. et al. Mitochondrial impairment as an early event in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevance to Parkinson's disease. **Biochem Pharmacol,** v. 56, n. 5, p. 645-55, Sep 01 1998.

MIELKE, K.; HERDEGEN, T. JNK and p38 stresskinases--degenerative effectors of signal-transduction-cascades in the nervous system. **Prog Neurobiol,** v. 61, n. 1, p. 45-60, May 2000.

MING, G. L.; SONG, H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. **Annu Rev Neurosci,** v. 28, p. 223-50, 2005.

MIYAWAKI, T. et al. The endogenous inhibitor of Akt, CTMP, is critical to ischemia-induced neuronal death. **Nat Neurosci,** v. 12, n. 5, p. 618-26, May 2009.

MOISES, H. W. et al. The glial growth factors deficiency and synaptic destabilization hypothesis of schizophrenia. **BMC Psychiatry,** v. 2, p. 8, Jul 03 2002.

MOLTENI, R. et al. Differential effects of acute and chronic exercise on plasticity-related genes in the rat hippocampus revealed by microarray. **Eur J Neurosci,** v. 16, n. 6, p. 1107-16, Sep 2002.

MONGIAT, L. A.; SCHINDER, A. F. Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. **Eur J Neurosci,** v. 33, n. 6, p. 1055-61, Mar 2011.

MORETTO, M. B. 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,** v. 85, n. 1, p. 639-46, May 2005a.

MORETTO, M. B. et al. Organoselenium compounds prevent hyperphosphorylation of cytoskeletal proteins induced by the neurotoxic agent diphenyl ditelluride in cerebral cortex of young rats. **Toxicology,** v. 210, n. 2-3, p. 213-22, Jun 1 2005b.

MORRIS, K. A.; GOLD, P. E. Age-related impairments in memory and in CREB and pCREB expression in hippocampus and amygdala following inhibitory avoidance training. **Mech Ageing Dev,** v. 133, n. 5, p. 291-9, May 2012.

MORRISON, J. H.; HOF, P. R. Life and death of neurons in the aging brain. **Science,** v. 278, n. 5337, p. 412-9, Oct 17 1997.

MURER, M. G. et al. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Prog Neurobiol,** v. 63, n. 1, p. 71-124, Jan 2001.

NARAJJI, C. et al. Biological importance of organoselenium compounds **Indian J Pharm Sci** v. 69, p. 344-351, 2007.

NEDERGAARD, M. et al. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. **Trends Neurosci,** v. 26, n. 10, p. 523-30, Oct 2003.

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

NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. **Arch Toxicol,** v. 85, n. 11, p. 1313-59, Nov 2011.

O'CALLAGHAN, J. P.; JENSEN, K. F. Enhanced expression of glial fibrillary acidic protein and the cupric silver degeneration reaction can be used as sensitive and early indicators of neurotoxicity. **Neurotoxicology,** v. 13, n. 1, p. 113-22, Spring 1992.

OHIRA, K.; HAYASHI, M. A new aspect of the TrkB signaling pathway in neural plasticity. **Curr Neuropharmacol,** v. 7, n. 4, p. 276-85, Dec 2009.

OKTYABRSKY, O. N.; SMIRNOVA, G. V. Redox regulation of cellular functions. **Biochemistry (Mosc),** v. 72, n. 2, p. 132-45, Feb 2007.

OLTON, D. S.; PAPAS, B. C. Spatial memory and hippocampal function. **Neuropsychologia,** v. 17, n. 6, p. 669-82, 1979.

OTA, Y. et al. The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation. **Neural Plast,** v. 2013, p. 185463, 2013.

PANEGYRES, P. K. The contribution of the study of neurodegenerative disorders to the understanding of human memory. **QJM,** v. 97, n. 9, p. 555-67, Sep 2004.

PARENTE, M. A. M. P. **Cognição e envelhecimento**. Porto Alegre: Artmed, 2006.

PATTERSON, S. L. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: Interactions of microglia, IL-1beta, BDNF and synaptic plasticity. **Neuropharmacology,** v. 96, n. Pt A, p. 11-8, Sep 2015.

PATTERSON, S. L. et al. Some forms of cAMP-mediated long-lasting potentiation are associated with release of BDNF and nuclear translocation of phospho-MAP kinase. **Neuron,** v. 32, n. 1, p. 123-40, Oct 11 2001.

PAXINOS, G. Hippocampal Formation. In: ELSEVIER ACADEMIC PRESS, U. (Ed.). **The rat Nervous Sistems**, v.21, 2004. p. 637 – 687.

PEKNY, M. Astrocytic intermediate filaments: lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. **Prog Brain Res,** v. 132, p. 23-30, 2001.

PELLEGRINOTTI, I. L. **Atividade Física e Esportes: a importância no contexto saúde do ser humano.** São Paulo: Manole, 200.

PIETRELLI, A. et al. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. **Neuroscience,** v. 202, p. 252-66, Jan 27 2012.

POLLACK, M. et al. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. **Ann N Y Acad Sci,** v. 959, p. 93-107, Apr 2002.

POO, M. M. Neurotrophins as synaptic modulators. **Nat Rev Neurosci,** v. 2, n. 1, p. 24-32, Jan 2001.

POSSER, T. et al. Diphenyl diselenide confers neuroprotection against hydrogen peroxide toxicity in hippocampal slices. **Brain Res,** v. 1199, p. 138-47, Mar 14 2008.

PUCILOWSKA, J. et al. Disrupted ERK signaling during cortical development leads to abnormal progenitor proliferation, neuronal and network excitability and behavior, modeling human neuro-cardio-facial-cutaneous and related syndromes. **J Neurosci,** v. 32, n. 25, p. 8663-77, Jun 20 2012.

QU, C. et al. c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) is required for coordination of netrin signaling in axon guidance. **J Biol Chem,** v. 288, n. 3, p. 1883-95, Jan 18 2013.

RAGE, F. et al. Effect of aging on the expression of BDNF and TrkB isoforms in rat pituitary. **Neurobiol Aging,** v. 28, n. 7, p. 1088-98, Jul 2007.

RAINE, C. S. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.** 2006

RAJKOWSKA, G. et al. Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. **Schizophr Res,** v. 57, n. 2-3, p. 127-38, Oct 01 2002.

RAMOS, A. T. **Atividade Física**. Rio de Janeiro: Sprint, 2005.

RANDO, T. A. Stem cells, ageing and the quest for immortality. **Nature,** v. 441, n. 7097, p. 1080-6, Jun 29 2006.

RASMUSSEN, P. et al. Evidence for a release of brain-derived neurotrophic factor from the brain during exercise. **Experimental Physiology,** v. 94, n. 10, p. 1062-1069, Oct 1 2009.

RAY, A. L. et al. Low serum selenium and total carotenoids predict mortality among older women living in the community: the women's health and aging studies. **J Nutr,** v. 136, n. 1, p. 172-6, Jan 2006.

REICHARDT, L. F. Neurotrophin-regulated signalling pathways. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,** v. 361, n. 1473, p. 1545-64, Sep 29 2006.

ROSA, R. M. et al. Facilitation of long-term object recognition memory by pretraining administration of diphenyl diselenide in mice. **Neurosci Lett,** v. 341, n. 3, p. 217-20, May 8 2003.

ROSENZWEIG, E. S.; BARNES, C. A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. **Prog Neurobiol,** v. 69, n. 3, p. 143-79, Feb 2003.

SAKAMOTO, K. et al. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. **J Neurochem,** v. 116, n. 1, p. 1-9, Jan 2011.

SAUMIER, D.; CHERTKOW, H. Semantic memory. **Curr Neurol Neurosci Rep,** v. 2, n. 6, p. 516-22, Nov 2002.

SAVEGNAGO, L. 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,** v. 88, n. 4, p. 418-26, Feb 2008.

SAVEGNAGO, L. et al. Antisecretory and antiulcer effects of diphenyl diselenide. **Environ Toxicol Pharmacol,** v. 21, n. 1, p. 86-92, Jan 2006.

SAWAMOTO, K. et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. **Science,** v. 311, n. 5761, p. 629-32, Feb 03 2006.

SCHWARZ, K.; FOLTZ, C. M. Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. 1951. **Nutrition,** v. 15, n. 3, p. 255, Mar 1999.

SCOVILLE, W. B.; MILNER, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. **J Neurol Neurosurg Psychiatry,** v. 20, n. 1, p. 11-21, Feb 1957.

SEGAL, R. A.; GREENBERG, M. E. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. **Annu Rev Neurosci,** v. 19, p. 463-89, 1996.

SEIFERT, T. et al. Endurance training enhances BDNF release from the human brain. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology,** v. 298, n. 2, p. R372-R377, Feb 2010.

SELCHER, J. C. et al. Mice lacking the ERK1 isoform of MAP kinase are unimpaired in emotional learning. **Learn Mem,** v. 8, n. 1, p. 11-9, Jan-Feb 2001.

SHAO, Y.; MCCARTHY, K. D. Plasticity of astrocytes. **Glia,** v. 11, n. 2, p. 147-55, Jun 1994.

SHEN, H. et al. Physical activity elicits sustained activation of the cyclic AMP response element-binding protein and mitogen-activated protein kinase in the rat hippocampus. **Neuroscience,** v. 107, n. 2, p. 219-29, 2001.

SIEGEL GJ., A. B., ALBERS RW., FISHER S.K., UHLER MD, . **Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular and Medical aspects.** 1999.

SIQUEIRA, I. R. et al. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. **Int J Dev Neurosci,** v. 23, n. 8, p. 663-71, Dec 2005.

SMALL, S. A. et al. A pathophysiological framework of hippocampal dysfunction in ageing and disease. **Nat Rev Neurosci,** v. 12, n. 10, p. 585-601, Oct 2011.

SMITH, P. J. et al. Aerobic exercise and neurocognitive performance: a meta-analytic review of randomized controlled trials. **Psychosom Med,** v. 72, n. 3, p. 239-52, Apr 2010.

SMORGON, C. et al. Trace elements and cognitive impairment: an elderly cohort study. **Arch Gerontol Geriatr Suppl**, n. 9, p. 393-402, 2004.

SOANE, L.; FISKUM, G. Inhibition of mitochondrial neural cell death pathways by protein transduction of Bcl-2 family proteins. **J Bioenerg Biomembr,** v. 37, n. 3, p. 179-90, Jun 2005.

SODERLING, T. R. CaM-kinases: modulators of synaptic plasticity. **Curr Opin Neurobiol,** v. 10, n. 3, p. 375-80, Jun 2000.

SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathol,** v. 119, n. 1, p. 7-35, Jan 2010.

SONGIN, M. et al. GSK-3beta and oxidative stress in aged brain. Role of poly(ADP- -ribose) polymerase-1. **Folia Neuropathol,** v. 45, n. 4, p. 220-9, 2007.

SOUZA, A. C. et al. Diphenyl diselenide improves scopolamine-induced memory impairment in mice. **Behav Pharmacol,** v. 21, n. 5-6, p. 556-62, Sep 2010.

SQUIRE, L. R. et al. Magnetic resonance imaging of the hippocampal formation and mammillary nuclei distinguish medial temporal lobe and diencephalic amnesia. **J Neurosci,** v. 10, n. 9, p. 3106-17, Sep 1990.

SQUIRE, R. L.; KANDEL, E. R. **Memória: da mente às moléculas.** Porto Alegre: Artmed, 2003.

STANGHERLIN, E. C. et al. Sub-chronical exposure to diphenyl diselenide enhances acquisition and retention of spatial memory in rats. **Brain Res,** v. 1201, p. 106-13, Mar 27 2008.

STAZI, A. V.; TRINTI, B. [Selenium deficiency in celiac disease: risk of autoimmune thyroid diseases]. **Minerva Med,** v. 99, n. 6, p. 643-53, Dec 2008.

STREIT, M. et al. Neurophysiological correlates of the recognition of facial expressions of emotion as revealed by magnetoencephalography. **Brain Res Cogn Brain Res,** v. 7, n. 4, p. 481-91, Mar 1999.

SUGAWARA, T. et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **NeuroRx,** v. 1, n. 1, p. 17-25, Jan 2004.

SUH, H. et al. Signaling in adult neurogenesis. **Annu Rev Cell Dev Biol,** v. 25, p. 253-75, 2009.

SUIJO, K. et al. Resistance exercise enhances cognitive function in mouse. **International Journal of Sports Medicine,** v. 34, n. 4, p. 368-75, Apr 2013.

SUZUKI, A. et al. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. **J Neurosci,** v. 31, n. 24, p. 8786-802, Jun 15 2011.

SWEATT, J. D. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **J Neurochem,** v. 76, n. 1, p. 1-10, Jan 2001.

_____. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. **Curr Opin Neurobiol,** v. 14, n. 3, p. 311-7, Jun 2004.

TANAKA, J. et al. Protein synthesis and neurotrophin-dependent structural plasticity of single dendritic spines. **Science,** v. 319, n. 5870, p. 1683-7, Mar 21 2008.

TAPIA-ARANCIBIA, L. et al. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. **Brain Res Rev,** v. 59, n. 1, p. 201-20, Nov 2008.

TARDY, M. Role of laminin bioavailability in the astroglial permissivity for neuritic outgrowth. **An Acad Bras Cienc,** v. 74, n. 4, p. 683-90, Dec 2002.

TEIXEIRA, I. N.; GUARIENTO, M. E. [Biology of aging: theories, mechanisms, and perspectives]. **Cien Saude Colet,** v. 15, n. 6, p. 2845-57, Sep 2010.

THOMAS, G. M.; HUGANIR, R. L. MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. **Nat Rev Neurosci,** v. 5, n. 3, p. 173-83, Mar 2004.

TYLER, W. J. et al. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. **Learn Mem,** v. 9, n. 5, p. 224-37, Sep-Oct 2002.

ULLIAN, E. M. et al. Control of synapse number by glia. **Science,** v. 291, n. 5504, p. 657-61, Jan 26 2001.

ULLMAN, M. T. Contributions of memory circuits to language: the declarative/procedural model. **Cognition,** v. 92, n. 1-2, p. 231-70, May-Jun 2004.

VAN DER BORGHT, K. et al. Exercise improves memory acquisition and retrieval in the Y-maze task: relationship with hippocampal neurogenesis. **Behav Neurosci,** v. 121, n. 2, p. 324-34, Apr 2007.

VAN DER HEIDE, L. P. et al. Insulin signaling in the central nervous system: learning to survive. **Prog Neurobiol,** v. 79, n. 4, p. 205-21, Jul 2006.

VAN PRAAG, H. Exercise and the brain: something to chew on. **Trends Neurosci,** v. 32, n. 5, p. 283-90, May 2009.

VAN PRAAG, H. et al. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 96, n. 23, p. 13427-31, Nov 09 1999a.

VAN PRAAG, H. et al. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci,** v. 2, n. 3, p. 266-70, Mar 1999b.

VAN PRAAG, H. et al. Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **J Neurosci,** v. 25, n. 38, p. 8680-5, Sep 21 2005.

VAYNMAN, S. et al. Hippocampal BDNF mediates the efficacy of exercise on synaptic plasticity and cognition. **Eur J Neurosci,** v. 20, n. 10, p. 2580-90, Nov 2004.

VILA, M.; PRZEDBORSKI, S. Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. **Nat Rev Neurosci,** v. 4, n. 5, p. 365-75, May 2003.

VON BOHLEN, O.; HALBACH, O. Involvement of BDNF in age-dependent alterations in the hippocampus. **Frontiers in Aging Neuroscience,** v. 2, Aug 13 2010.

WAETZIG, V.; HERDEGEN, T. Neurodegenerative and physiological actions of c-Jun N-terminal kinases in the mammalian brain. **Neurosci Lett,** v. 361, n. 1-3, p. 64-7, May 06 2004.

WALKER, S. A. et al. Control of Ras cycling by Ca2+. **FEBS Lett,** v. 546, n. 1, p. 6-10, Jul 03 2003.

WANG, D. D.; BORDEY, A. The astrocyte odyssey. **Prog Neurobiol,** v. 86, n. 4, p. 342-67, Dec 11 2008.

WANG, Y. et al. Downregulation of toll-like receptor 4 induces suppressive effects on hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma via ERK1/2 signaling. **BMC Cancer,** v. 15, p. 821, 2015.

WHITWELL, J. L.; JACK, C. R., JR. Comparisons between Alzheimer disease, frontotemporal lobar degeneration, and normal aging with brain mapping. **Top Magn Reson Imaging,** v. 16, n. 6, p. 409-25, Dec 2005.

WILHELM, E. A. et al. Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. **Pathophysiology,** v. 16, n. 1, p. 31-7, Jun 2009.

WU, G. Y. et al. Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. **Nat Neurosci,** v. 4, n. 2, p. 151-8, Feb 2001.

YANG, J. et al. Neuronal release of proBDNF. **Nat Neurosci,** v. 12, n. 2, p. 113-5, Feb 2009.

YANO, H.; CHAO, M. V. Neurotrophin receptor structure and interactions. **Pharm Acta Helv,** v. 74, n. 2-3, p. 253-60, Mar 2000.

YIN, F. et al. Mitochondrial energy metabolism and redox signaling in brain aging and neurodegeneration. **Antioxid Redox Signal,** v. 20, n. 2, p. 353-71, Jan 10 2014.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain Behav Immun,** v. 25, n. 2, p. 181-213, Feb 2011.

ZAMBALDI, P. A. et al. The effect of balance training in a group of community-dwelling elderly women: a pilot study of a specific, non-systematic and short-term approach. **ACTA FISIATR,** v. 14, p. 17-24, 2007.

ZHANG, Y.; PARDRIDGE, W. M. Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier. **J Neurochem,** v. 76, n. 5, p. 1597-600, Mar 2001.

ZHAO, C. et al. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. **Cell,** v. 132, n. 4, p. 645-60, Feb 22 2008.

ZHU, J. J. et al. Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. **Cell,** v. 110, n. 4, p. 443-55, Aug 23 2002.

ZIV, I.; MELAMED, E. Editorial: apoptosis in the aging brain. **Apoptosis,** v. 15, n. 11, p. 1285-91, Nov 2010.

# ANEXO A – Carta de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM:

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

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos da suplementação com disseleneto de difenila e do exercício físico de natação na memória de ratos Wistar jovens e velhos", protocolado sob o CEUA nº 5394050115, sob a responsabilidade de **Gilson Zeni** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) em reunião de 06/05/2015.

We certify that the proposal "Effects of supplementation with diphenyl diselenide and physical swimming exercise in memory of young and old rats Wistar.", utilizing 80 Heterogenics rats (80 males), protocol number CEUA 5394050115, under the responsibility of **Gilson Zeni** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 05/06/2015.

Vigência da Proposta: de 03/2015 a 09/2017 Área: Bioquímica E Biologia Molecular

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Procedência: | Biotério Central UFSM | | | | | | |
| Espécie: | Ratos heterogênicos | sexo: | Machos | idade: | 4 a 4 meses | N: | 40 |
| Linhagem: | Wistar | | | Peso: | 200 a 200 g | | |
| Procedência: | Biotério Central UFSM | | | | | | |
| Espécie: | Ratos heterogênicos | sexo: | Machos | idade: | 18 a 18 meses | N: | 40 |
| Linhagem: | Wistar | | | Peso: | 450 a 450 g | | |

Resumo: O envelhecimento ocorre em todos os níveis celulares do organismo, sendo definido como um processo deteriorativo, progressivo e irreversível. Uma característica importante do processo de envelhecimento é a perda gradual da memória. Dada a escassez de medidas terapêuticas efetivas para o déficit de memória no envelhecimento, uma importante tendência de investigação científica é a pesquisa de novos compostos com propriedades neuroprotetoras. Um desses compostos é o disseleneto de difenila (PhSe)2, que é um composto orgânico de selênio que tem demonstrado diversas propriedades farmacológicas. Além disto, estudos comportamentais realizados em animais indicam que o exercício crônico é benéfico para a memória e o aprendizado. O objetivo deste estudo será avaliar o efeito da associação da suplementação de (PhSe)2 (dose de 1 ppm na ração, durante 1 mês) e do exercício físico aeróbico de natação (5 dias por semana, 20 minutos por dia, durante 5 semanas, sendo as 4 últimas com uma sobrecarga de 3% do peso corporal) no déficit de memória e em alterações moleculares em ratos Wistar velhos. Com este projeto pretende-se contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que associem exercício físico e compostos orgânicos de selênio, como o (PhSe)2, para a melhora da memória.

Santa Maria, 07 de abril de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Avenida Roraima, 1000, Reitoria, 2º andar - CEP 97105-900 Santa Maria, RS - tel: 55 (55) 3220-9362 / fax: 55 (55) 3220-8009
Horário de atendimento: das 8:30 às 11:30 e 14:00 às 16:30hs : e-mail: ceua.ufsm@gmail.com
CEUA N 5394050115