

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional
Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte

Daniel Massote de Melo Leite

TREINAMENTO FÍSICO E SUPLEMENTAÇÃO DE FLAVONÓIS DE CACAU:
impactos no desempenho físico, memória e respostas neurotróficas,
imunoquímicas e de estresse oxidativo em um modelo experimental de
envelhecimento por D-galactose

Belo Horizonte
2024

Daniel Massote de Melo Leite

**TREINAMENTO FÍSICO E SUPLEMENTAÇÃO DE FLAVONÓIS DE CACAU:
impactos no desempenho físico, memória e respostas neurotróficas,
imunoquímicas e de estresse oxidativo em um modelo experimental de
envelhecimento por D-galactose**

Tese de doutorado apresentado à banca examinadora de qualificação do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, como requisito para obtenção do título de doutor em Ciências do Esporte.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Danusa Dias Soares

Belo Horizonte

2024

L533t Leite, Daniel Massote de Melo
2024 Treinamento físico e suplementação de flavonóis de cacau: impactos no desempenho físico, memória e respostas neurotróficas, imunoquímicas e de estresse oxidativo em um modelo experimental de envelhecimento por D-galactose. [manuscrito] / Daniel Massote de Melo Leite – 2024.
143 f.: il.

Orientador: Danusa Dias Soares

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional.
Bibliografia: f. 82-93

1. Envelhecimento – Teses. 2. Exercícios físicos – Aspectos fisiológicos – Teses. 3. Galactose – Teses. I. Soares, Danusa Dias. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional. III. Título.

CDU: 612:796

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Sheila Margareth Teixeira Adão, CRB 6: nº 2106, da Biblioteca da Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional da UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE EDUCAÇÃO FÍSICA, FISIOTERAPIA E TERAPIA OCUPACIONAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DO ESPORTE

ATA DE DEFESA DE TESE

DANIEL MASSOTE DE MELO LEITE

Às **14:00 horas** do dia **04 de abril de 2024**, a comissão examinadora, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Esporte, reuniu-se presencialmente e por videoconferência, para julgar, em exame final, a tese intitulada "**Treinamento Físico e Suplementação de Flavonóis de Cacau: Impactos no Desempenho Físico, Memória e Respostas Neurotróficas, Imunoquímicas e de Estresse Oxidativo em um Modelo Experimental de Envelhecimento por D-Galactose**". Abrindo a sessão, a presidente da comissão, Profa. Dra. Danusa Dias Soares (EEFFTO/UFMG), orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares de Defesa do Trabalho Final, passou a palavra para o candidato, que realizou a apresentação da sua tese. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Profa. Dra. Danusa Dias Soares - Orientadora (UFMG)
Profa. Dra. Daniele Cristina de Aguiar (UFMG)
Profa. Dra. Josiane Budni (UNESC)
Prof. Dr. Luciano Sales Prado (UFMG)
Profa. Dra. Suzete Maria Cerutti (UNIFESP)
Prof. Dr. Ricardo Mário Arida (UNIFESP)

Após as indicações, o candidato foi considerado **APROVADO**.

Nada mais havendo a tratar, eu, Profa. Dra. Danusa Dias Soares, presidente da comissão examinadora, dei por encerrada a reunião, da qual, para constar, lavrei a presente Ata, que, lida e aprovada, vai por todos assinada eletronicamente.

Belo Horizonte, 05 de abril de 2024.

Assinatura dos membros da comissão examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Suzete Maria Cerutti, Usuário Externo**, em 07/04/2024, às 22:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniele Cristina de Aguiar, Professora do Magistério Superior**, em 08/04/2024, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Mario Arida, Usuário Externo**, em 08/04/2024, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danusa Dias Soares, Professora do Magistério Superior**, em 09/04/2024, às 09:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano Sales Prado, Professor do Magistério Superior**, em 23/04/2024, às 13:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Josiane Budni, Usuário Externo**, em 22/08/2024, às 22:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3157695** e o código CRC **FCD6E570**.

Dedico este trabalho a toda a minha família. Sem vocês, eu não teria conseguido superar todos os desafios encontrados ao longo da minha jornada, os quais foram essenciais para a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me concedido saúde para conseguir cumprir esta etapa em minha vida. Várias pessoas foram importantes para a realização desta Tese. Agradeço imensamente:

À minha mãe, Lusiane, por todo o apoio e encorajamento quando as situações experimentais pareciam não caminhar para um desfecho positivo. Agradeço ao meu querido pai por todos os conselhos e pelas ligações semanais durante esses anos de doutoramento.

Ao meu irmão Lucas, minha cunhada Ludi, por todo o apoio, e aos meus sobrinhos Luísa e Marcos, que sempre me receberam com sorriso e carinho, incentivando-me sempre a continuar.

À minha amada Talita, por me apoiar em todos os momentos, e principalmente por ter paciência e me amar nos momentos difíceis, quando realizava experimentos de longa duração e passava muitas horas no laboratório. Te amo!

À Professora Dra. Danusa Dias Soares, pela confiança e oportunidade em aceitar o desafio de orientar um aluno "inexperiente", auxiliando-me no aprendizado, encorajando-me a melhorar a escrita, as apresentações públicas e a sempre buscar o conhecimento baseado na ciência, fazendo-me enxergar o valor desse conhecimento para alcançar objetivos maiores na minha formação. Muito obrigado! Por fim, agradeço por não me deixar desistir desse sonho, encorajando-me sempre.

Aos Professores Dr. Samuel Penna Wanner e Dr. Dawit Albieiro Pinheiro Gonçalves, agradeço por todas as sugestões, assistência e auxílio para o desenvolvimento deste trabalho. Por fim, apesar de torcermos para times diferentes (risos), agradeço ao Samu por todas as discussões futebolísticas ocorridas durante os intervalos no laboratório, deixando o ambiente mais leve (risos).

Agradeço imensamente ao Professor Dr. Ricardo Cassilhas do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PMPGCF/ UFVJM) e ao seu aluno de doutorado Caíque Olegário Diniz e Magalhães pelos ensinamentos e orientação de procedimentos experimentais. Muito obrigado!

Agradeço às Professoras Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite e Dra. Paola Caroline Lacerda Leocádio por disponibilizarem o Laboratório de Lipídeos, Aterosclerose e Bioquímica Nutricional do ICB para o ensino e realização de diversas análises. Agradeço também à Professora Dra. Gleide Fernandes Avelar do

Departamento de Morfologia do ICB pela parceria no desenvolvimento dos projetos. Agradecer também à Professora Dra. Daniele Cristina de Aguiar do Departamento de Farmacologia do ICB pelo auxílio e sugestões na análise dos dados cognitivos.

Agradeço aos colegas e ex-colegas do Lafise: Marcelo, Maicon, Alinex, Guilherme, Bruno Melo, Camila, Júlia, João Gabriel, Pedro Willian, Gustavo, Roberto Carlos e Talles por me auxiliarem em todas as etapas do doutoramento.

Agradeço às técnicas de laboratório Mara Livia (ICB) e Maíra (LAFISE) pelo apoio em conseguir os materiais necessários para as análises, e aos colegas do ICB, Nícia, Bárbara, Wanderson e Aline pela parceria.

A todos vocês minha gratidão!

“A paciência e a perseverança é um dos métodos mais eficientes que usamos para conquistar um objetivo”.

Michel Franklly

RESUMO

O envelhecimento pode promover efeitos irreversíveis causando danos ao organismo, resultando em comprometimento progressivo das habilidades funcionais e cognitivas. A etiologia do envelhecimento ainda não é totalmente compreendida, e para tentar compreender os mecanismos fisiológicos relacionados ao envelhecimento para a melhoria da qualidade de vida dessa população, modelos de envelhecimento têm sido desenvolvidos em laboratório usando roedores. A D-galactose, um açúcar redutor tem sido utilizado como um modelo animal mimético ao envelhecimento. Para mitigar os efeitos deletérios do envelhecimento, o treinamento físico combinado e as intervenções nutricionais tem se mostrado eficaz no controle de déficits metabólicos e cognitivos em idosos. Dietas ricas em flavonóis encontrados no cacau, tem sido utilizada para prevenir doenças e atenuar o processo de envelhecimento. Embora a suplementação com flavonóis e o treinamento combinado possam trazer diversos benefícios à saúde, os efeitos sinérgicos da ingestão crônica sobre parâmetros cognitivos e inflamatórios associados ao envelhecimento não foram extensivamente investigados. Para alcançar os objetivos desta tese, dividimos o trabalho em dois estudos: 1) Efeitos do envelhecimento, no desempenho físico, na memória, perfil inflamatório e estresse oxidativo em ratos; 2) Efeitos do treinamento físico e/ou da suplementação de flavonóis do cacau sobre o desempenho físico aeróbico e de força muscular, a memória, BDNF e marcadores inflamatórios em um modelo experimental de envelhecimento. No estudo 1, ratos Wistar com semanas de idade receberam 150 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de D-Galactose (D-GAL) ou solução salina (CON) intraperitoneal durante 8 semanas e avaliado o desempenho físico de força muscular e aeróbico no período pré, quarta e oitava semana de intervenção. A memória de curto e longo prazo foi avaliada no período pré e após a oitava semana. Houve diminuição de desempenho aeróbico no grupo D-GAL, incluindo, VO₂pico ($p=0,044$), TTE ($p = 0,023$) na 4ª semana, e trabalho ($p = 0,011$) na 4ª e 8ª semana de D-GAL ($p = 0,041$). A memória de longo prazo foi reduzida no grupo D-GAL ($p < 0,001$) associada ao aumento do estresse oxidativo e diminuição de IL-10 no cérebro e musculo sóleo e EDL no grupo D-GAL ($p < 0,05$). A razão pró-inflamatória de IL-1 β / IL-10 no sóleo e córtex frontal foi aumentada no grupo D-GAL ($p < 0,05$). Para o estudo 2 foram utilizados ratos Wistar com dois meses de idade ($n=9$ por grupo) que receberam 150 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de D-GAL por 8 semanas e divididos em quatro grupos experimentais: (PLA e CACAU) repouso, e TC (CACAU e PLA) que realizaram treinamento físico combinado (TC) em dias alternados em escada (8 séries, 50% a 100% do TFM) e corrida em esteira por 30 min (60% Vpico) e suplementados com cacau enriquecido com flavonóis e/ou placebo (45 mg.kg⁻¹.dia⁻¹) 1x ao dia, 5x semana, por 8 semanas. Após o TC foi avaliado a memória de curto e longo prazo. O grupo TC obtiveram maiores ganhos de força, TTE, Vpico e trabalho vs. REP ($p < 0,01$). Na MCP o grupo REP COCOA restaurou a cognição vs. REP PLA ($p = 0,01$). A citocina IL-6 no hipocampo foi reduzida no grupo TC COCOA vs. TC PLA ($p = 0,03$). Além disso, o TC elevou BDNF no hipocampo vs. REP PLA ($p = 0,04$). A suplementação de cacau foi eficaz em atenuar a inflamação muscular de IL-6 no sóleo vs. REP PLA.

Palavras-chave: Envelhecimento. D-Galactose. Treinamento. Polifenóis. Citocinas. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Aging can promote irreversible effects, causing damage to the body, resulting in a progressive impairment of functional and cognitive abilities. The etiology of aging is still not fully understood, and in order to better comprehend the physiological mechanisms related to aging and improve the quality of life in this population, aging models have been developed in the laboratory using rodents. D-galactose, a reducing sugar, has been used as an animal model that mimics aging. To mitigate the deleterious effects of aging, combined physical training and nutritional interventions have proven effective in controlling metabolic and cognitive deficits in the elderly. Diets rich in flavonols found in cocoa have been used to prevent diseases and attenuate the aging process. Although supplementation with flavonols and combined training can bring various health benefits, the synergistic effects of chronic intake on cognitive and inflammatory parameters associated with aging have not been extensively investigated. To achieve the objectives of this thesis, the work was divided into two studies: 1) Effects of aging on physical performance, memory, inflammatory profile, and oxidative stress in rats; 2) Effects of physical training and/or supplementation with cocoa flavonols on aerobic and muscular strength performance, memory, BDNF, and inflammatory markers in an experimental aging model. In study 1, eight-week-old Wistar rats received 150 mg.kg⁻¹.day⁻¹ of D-Galactose (D-GAL) or saline solution (CON) intraperitoneally for 8 weeks, and their muscle strength and aerobic physical performance were evaluated in the pre, fourth, and eighth weeks of intervention. Short- and long-term memory were assessed in the pre-period and after the eighth week. There was a decrease in aerobic performance in the D-GAL group, including VO₂peak ($p = 0.044$), TTE ($p = 0.023$) in the 4th week, and work ($p = 0.011$) in the 4th and 8th weeks of D-GAL ($p = 0.041$). Long-term memory was reduced in the D-GAL group ($p < 0.001$) and was associated with increased oxidative stress and decreased IL-10 in the brain and soleus and EDL muscles in the D-GAL group ($p < 0.05$). The pro-inflammatory ratio of IL-1 β / IL-10 in the soleus and frontal cortex was increased in the D-GAL group ($p < 0.05$). In study 2, two-month-old Wistar rats ($n=9$ per group) received 150 mg.kg⁻¹.day⁻¹ of D-GAL for 8 weeks and were divided into four experimental groups: (PLA and COCOA) rest, and TC (COCOA and PLA), which performed combined physical training (TC) on alternate days using a ladder (8 sets, 50% to 100% of the maximal load) and treadmill running for 30 min (60% VO₂peak), and were supplemented with flavonol-enriched cocoa and/or placebo (45 mg.kg⁻¹.day⁻¹) once daily, 5x per week, for 8 weeks. After the TC, short- and long-term memory were assessed. The TC group achieved greater gains in strength, TTE, VO₂peak, and work vs. REST ($p < 0.01$). In the short-term memory test, the REST.COCOA group restored cognition vs. REST. PLA ($p = 0.01$). IL-6 cytokine in the hippocampus was reduced in the TC COCOA group vs. TC PLA ($p = 0.03$). Additionally, TC elevated BDNF in the hippocampus vs. REST. PLA ($p = 0.04$). Cocoa supplementation was effective in attenuating IL-6 inflammation in the soleus muscle vs. REST.PLA.

Keywords: Ageing. D-Galactose. Training. Polyphenols. Cytokines. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hipóteses do estudo 1.....	26
Figura 2 - Hipóteses do estudo 2.....	27
Figura 3 – Delineamento experimental do estudo 1	30
Figura 4 – Etapas do Teste de Reconhecimento de Objetos para a avaliação da memória de curto (MCP) e longo (MLP) prazo	32
Figura 5 – Etapas do Teste de Força máxima muscular em escada vertical	33
Figura 6 – Massa corporal, índice de adiposidade e massa muscular relativa após 8 semanas de D-Galactose.....	38
Figura 7 – Força muscular relativa, VO ₂ pico, Tempo total de exercício, Vpico e Trabalho total (J) durante a quarta semana e após 8 semanas de D-Galactose.	40
Figura 8 - Níveis de hidroperóxidos de lipídios e citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 após 8 semanas de D-Galactose.....	42
Figura 9 – Níveis de hidroperóxidos de lipídios e de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória de TNF- α , IL-1 β e IL-10 após 8 semanas de D-Galactose.	44
Figura 10 - Memória de curto e longo prazo antes e após 8 semanas de D-Galactose.....	45
Figura 11 - Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxidos de lipídios e citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 no hipocampo após 8 semanas de D-Galactose.	47
Figura 12 - Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxidos de lipídios e citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória de TNF- α , IL-1 β e IL-10 no córtex frontal após 8 semanas de D-Galactose.....	49
Figura 13 - Delineamento experimental do estudo 2	59
Figura 14 - Massa corporal total, índice de adiposidade, massa muscular relativo à massa corporal total do músculo sóleo e EDL após oito semanas de treinamento físico e/ou suplementação de flavonóis do cacau.	65
Figura 15 - Delta (Δ) da força relativa pela massa corporal, do tempo total de exercício, da velocidade pico e do trabalho realizado após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico	66
Figura 16 - Citocinas de ação pró e anti-inflamatória no músculo sóleo após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico	67

Figura 17 - Índice de reconhecimento de objetos da memória de curto prazo e da memória de longo prazo após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico.....	68
Figura 18 - Concentração de fator neurotrófico derivado do cérebro no hipocampo e no córtex frontal após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico.....	69
Figura 19 - Citocinas de ação pró-inflamatória e anti-inflamatória no tecido hipocampo após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico	71
Figura 20 - Citocinas de ação pró-inflamatória e anti-inflamatória no tecido córtex pré-frontal após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico..	72
Figura 21 – Diagrama esquemático dos efeitos deletérios causados pela D-GAL no cérebro (Hipocampo e córtex frontal) e músculo esquelético (Sóleo e EDL) de ratos.	79
Figura 22 – Diagrama esquemático dos benefícios da suplementação de flavonóis do cacau <i>per si</i> na memória de curto prazo e na redução da inflamação de IL-6 no músculo sóleo.....	80
Figura 23 - Treinamento com dois objetos iguais no período pré e após 8 semanas de D-GAL do estudo 1..	93
Figura 24 - Treinamento com dois objetos iguais após 8 semanas de treinamento físico e/ou suplementação com flavonóis do cacau do estudo 2..	93
Figura 25 - Correlação entre a concentração de citocina anti-inflamatória IL-10 e VO ₂ pico e a concentração de estresse oxidativo por hidroperóxidos e tempo total de exercício (TTE min).....	94
Figura 26 - Correlação entre a concentração de TBARS e índice de reconhecimento da memória de curto prazo (MCP), hidroperóxidos de lipídios e índice de reconhecimento da memória de curto (MCP) e longo prazo (MLP) e citocina pró-inflamatória IL-1 β e índice de reconhecimento da memória de curto (MCP) e longo prazo (MLP)	95
Figura 27 - Correlação entre a concentração de TBARS e o índice de reconhecimento de objetos da memória de curto (MCP) e longo prazo (MLP), hidroperóxidos de lipídios e o índice de reconhecimento da memória de curto (MCP)	

e longo prazo (MLP) e citocina pró-inflamatória IL-1 β e o índice de reconhecimento de objetos da memória de curto (MCP)	96
Figura 28 - Variáveis de desempenho físico no período de D-galactose antes da intervenção com treinamento físico e/ou suplementação com flavonóis do cacau..	97
Figura 29 - Massa corporal total, índice de adiposidade, massa muscular do músculo sóleo e EDL após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA)..	98
Figura 30 - Delta (Δ) da força relativa pela massa corporal, do tempo total de exercício, da velocidade pico e do trabalho realizado após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA).....	99
Figura 31 - Citocinas de ação pró e anti-inflamatória no músculo sóleo após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA).....	100
Figura 32 - Índice de reconhecimento da memória de curto prazo e da memória de longo prazo após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA).....	101
Figura 33 - Citocinas de ação pró-inflamatória e anti-inflamatória no hipocampo após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA)..	102
Figura 34 - Citocinas de ação pró e anti-inflamatória no córtex frontal após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA).....	103
Figura 35 - Concentração de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo e no córtex pré-frontal após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA).....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGES	Produtos finais de glicação avançada
AKT	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de Variância
ATROGIN1	F-box protein 32
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BCL-xl	B-cell lymphoma-extra large
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
BHT	Hidroxitolueno butilado
CACAU	Grupo suplementado com flavonóis do cacau
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CM	Carga máxima
CON	Grupo Controle
CONCEA	Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal
COX 2	Cyclooxygenase-2
CREB	CAMP response element-binding protein
D-GAL	D-Galactose
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDL	Músculo extensor longo dos dedos
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FOXO 3a	Forkhead box O3a
G	Unidade de medida em gramas
GRIP	Teste de força neuromuscular
HCL	Ácido clorídrico
I.P.	Injeção intraperitoneal
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-1R	Receptor do Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IKB	Inibidor da kappa B

IKK	Quinase IκB
IKKβ	Subunidade β da quinase IκB
IL-10	Interleucina-10
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
J	Sistema Internacional de medida de energia em joules
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KG	Unidade de medida em quilogramas
LO	Lipídios oxidados
LOO	Hidroperóxidos de lipídios
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolissacarídeo
m.A	Unidade de medida de energia em miliamperes
m.min	Metros por minuto
MAFBX	Proteína F-box da Atrofia Muscular
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MC	Massa corporal
MCP	Memória de curto prazo
MG	Unidade de medida em miligramas
MLP	Memória de longo prazo
MRO	Memória de reconhecimento de objetos
MTT	Brometo de Dimetiltiazoldifeniltetrazolium
NF-KB	Fator nuclear kappa B
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
NIH	National Institutes of Health
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PG.ML	Picograma por mililitro
PGC1α	Coativador 1-alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-quinase
PLA	Grupo Placebo
PNAD	Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
PTN	Proteína

REP	Grupo repouso
RPM	Rotações por minuto
SAMP8	Senescência acelerada 8
SEN(θ)	Seno do ângulo
SIRT-1	Sirtuína 1
SNC	Sistema nervosa central
STZ	Estreptozotocina
SUPL	Suplementação
T	Tempo
TAE	Tecidos Adiposos Epididimal
TAM	Tecidos Adiposos Mesentérico
TAR	Tecidos Adiposos Retroperitoneal
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TC	Grupo de treinamento físico combinado
TCA	Ácido Tricloroacético
TFM	Teste de força máxima em escada vertical
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TTE	Tempo total de exercício
V	Velocidade
VO₂máx	Consumo máximo de oxigenação
VO₂pico	Consumo pico de oxigênio
VPICO	Velocidade pico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1	<i>Modelos experimentais de envelhecimento.....</i>	18
1.2	<i>Exercício físico e envelhecimento</i>	21
1.3	<i>Suplementação de flavonóis do cacau e envelhecimento</i>	22
2	OBJETIVOS GERAIS	25
2.1	Objetivos específicos	25
2.2	Hipóteses.....	26
3	ESTUDO 1 – Efeitos do envelhecimento no desempenho físico, na memória, perfil inflamatório e estresse oxidativo em ratos.....	29
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1.1	<i>Animais e cuidados éticos.....</i>	29
3.1.2	<i>Delineamento experimental</i>	29
3.1.3	<i>Indução ao envelhecimento</i>	31
3.1.4	<i>Desempenho de força muscular</i>	32
3.1.5	<i>Capacidade aeróbica máxima e desempenho aeróbico.....</i>	34
3.1.6	<i>Eutanásia, índice de adiposidade e massa muscular.....</i>	34
3.1.7	<i>Parâmetros de estresse oxidativo</i>	35
3.1.8	<i>Avaliação da peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....</i>	35
3.1.9	<i>Avaliação da concentração de hidroperóxidos</i>	36
3.1.10	<i>Análise estatística</i>	37
3.2	RESULTADOS	37
3.2.1	<i>Composição corporal e índice de adiposidade.....</i>	37
3.2.2	<i>Desempenho físico</i>	39
3.2.3	<i>Análises no músculo esquelético</i>	41
3.2.4	<i>Memória de reconhecimento.....</i>	45
3.2.5	<i>Análises no hipocampo</i>	46
3.2.6	<i>Análises no córtex frontal.....</i>	48
3.3	DISCUSSÃO.....	50
3.4	CONCLUSÃO DO ESTUDO 1	56
4	EXPERIMENTO 2 – TREINAMENTO FÍSICO E SUPLEMENTAÇÃO DE FLAVONÓIS DE CACAU: IMPACTOS NO DESEMPENHO FÍSICO, MEMÓRIA E	

RESPOSTAS NEUROTROFICAS, IMUNOQUÍMICAS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ENVELHECIMENTO POR D- GALACTOSE	57
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS	57
4.1.1 <i>Animais e cuidados éticos.....</i>	57
4.1.2 <i>Delineamento experimental</i>	57
4.1.3 <i>Indução ao envelhecimento</i>	59
4.1.4 <i>Memória de reconhecimento.....</i>	59
4.1.5 <i>Desempenho de força muscular</i>	60
4.1.6 <i>Capacidade aeróbica máxima e desempenho aeróbico.....</i>	61
4.1.7 <i>Protocolo de treinamento combinado.....</i>	61
4.1.8 <i>Suplementação de flavonóis do cacau e solução placebo</i>	62
4.1.9 <i>Eutanásia, índice de adiposidade e massa muscular.....</i>	62
4.1.10 <i>Citocinas pró e anti-inflamatórias</i>	63
4.1.11 <i>Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)</i>	63
4.1.12 <i>Análise estatística</i>	63
4.2 RESULTADOS	64
4.2.1 <i>Composição corporal, índice de adiposidade e massa muscular</i>	64
4.2.2 <i>Desempenho físico</i>	65
4.2.3 <i>Análises no músculo sóleo.....</i>	66
4.2.4 <i>Memória de reconhecimento.....</i>	67
4.2.5 <i>Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)</i>	69
4.2.6 <i>Análises no hipocampo</i>	70
4.2.7 <i>Análises no córtex frontal.....</i>	71
4.3 DISCUSSÃO.....	72
4.4 CONCLUSÃO ESTUDO 2	78
4.5 CONCLUSÃO GERAL:	79
Estudo 1:.....	79
Estudo 2:	80
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE A – Tempo de exploração entre dois objetos iguais na fase de treinamento do teste de memória (MRO)	93

APÊNDICE B – Correlação entre o nível de IL-10 no músculo esquelético sóleo e desempenho físico de VO₂pico e a concentração de hidroperóxidos de lipídios e tempo total de exercício (min)	94
APÊNDICE C – Correlação entre a concentração de TBARS, hidroperóxidos de lipídios e citocina pró-inflamatória IL-1β no hipocampo e índice de reconhecimento da memória de curto (MCP) e longo prazo (MLP).....	95
APÊNDICE D – Correlação entre a concentração de TBARS, hidroperóxidos de lipídios e citocina pró-inflamatória IL-1β no córtex frontal e índice de reconhecimento da memória de curto (MCP) e longo prazo (MLP).....	96
APÊNDICE E - Desempenho de força muscular máxima e aeróbico no período de administração de D-galactose, antes da intervenção com treinamento físico e/ou suplementação com flavonóis do cacau.....	97
APÊNDICE F - Comparação das variáveis de massa corporal, índice de adiposidade e massa dos músculos sóleo e EDL após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo	98
APÊNDICE G - Comparação das variáveis de desempenho físico de força máxima e aeróbico após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo.....	99
APÊNDICE H - Citocinas de ação pró-inflamatória e anti-inflamatória no músculo sóleo após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo.....	100
APÊNDICE I - Memória de reconhecimento de objetos após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo	101
APÊNDICE J - Citocinas de ação pró-inflamatória e anti-inflamatória no hipocampo após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo	102
APÊNDICE L - Citocinas de ação pró-inflamatória e anti-inflamatória no córtex frontal após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo	103
APÊNDICE M - Concentração de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo e no córtex frontal após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo	104
APÊNDICE N – ARTIGO: AGING-RELATED CHANGES INDUCED BY D-GALACTOSE INJECTION: IMPACT ON PHYSICAL PERFORMANCE, MEMORY FUNCTION, INFLAMMATORY RESPONSE, AND OXIDATIVE STRESS IN RAT MODELS	105
ANEXOS.....	137

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA–UFMG)
137

**ANEXO B – Certificado de capacitação no uso e manejo de animais de
laboratório 139**

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A projeção do número de pessoas idosas tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas. Esse crescimento notável está associado ao aumento da expectativa de vida desde o nascimento, paralelamente ao avanço da medicina e das pesquisas em gerontologia.

De acordo com dados do Departamento de Assuntos Econômicos e Sociais das Nações Unidas (United Nations, 2022), aproximadamente 771 milhões de pessoas em todo o mundo têm 65 anos ou mais, e as projeções indicam um aumento exponencial desse número, podendo atingir 1,6 bilhão de pessoas até 2050 (United Nations, 2022). No Brasil, a população idosa com 60 anos ou mais chegou a 32,1 milhões de pessoas, alcançado a marca de 15,8% da população do país (IBGE, 2022).

O processo de envelhecimento pode causar danos a moléculas, células e tecidos do organismo, levando ao comprometimento progressivo da funcionalidade, resultando na perda de força muscular, capacidade aeróbica e cognitiva (Garatachea *et al.*, 2015; Isaac *et al.*, 2021). Esses aspectos estão associados a fatores de risco para o desenvolvimento de diversas doenças, principalmente as crônicas não transmissíveis, com o avanço da idade (Garatachea *et al.*, 2015). Evidências científicas tem mostrado que o envelhecimento pode promover o aumento na expressão de citocinas inflamatórias de IL-6, IL-1B e TNF- α no hipocampo, córtex frontal e músculo esquelético (Garatachea *et al.*, 2015; Belletini-Santos *et al.*, 2022) ocasionado por um processo inflamatório crônico conhecido como “*inflammaging*” (inflamação crônica relacionada ao envelhecimento) (Francheschi *et al.*, 2018). Esse fenômeno é caracterizado por um aumento sistêmico nos marcadores pró-inflamatórios e uma diminuição nos fatores anti-inflamatórios, contribuindo para o processo de envelhecimento e o desenvolvimento de doenças relacionadas à idade. Acredita-se que a inflamação do envelhecimento resulte de uma combinação de fatores, incluindo senescência celular, desregulação do sistema imunológico e acumulação de danos ao longo do tempo. Essa inflamação crônica pode perturbar a homeostase tecidual, prejudicar a função celular e promover a progressão de condições relacionadas à idade (Garatachea *et al.*, 2015; Francheschi *et al.*, 2018).

Associado a inflamação, no processo de envelhecimento há um aumento notável no estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade dos mecanismos de defesa antioxidante de neutralizá-las. Esse fenômeno surge devido a vários fatores, incluindo o metabolismo celular, estressores ambientais e escolhas de estilo de vida, levando a danos cumulativos aos componentes celulares, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. A acumulação de danos oxidativos ao longo do tempo contribui para a patogênese de doenças relacionadas ao envelhecimento, incluindo distúrbios neurodegenerativos, musculoesqueléticos, doenças cardiovasculares e câncer. (Liguori *et al.*, 2018)

No músculo esquelético, sabe-se que vários distúrbios, como sarcopenia e caquexia, associados ao envelhecimento e a doenças crônicas, podem levar à perda de massa e força muscular em diferentes graus, afetando gravemente a saúde humana (Yuan; Larsson, 2023). A função mitocondrial é também determinante para o desempenho adequado do músculo esquelético. O processo de inflamação crônica, associado ao aumento do estresse oxidativo, observados no envelhecimento, concorrem em parte, para a disfunção mitocondrial no músculo esquelético, levando, dentre outros, a um declínio na capacidade oxidativa tecidual (Betika; Heppel, 2008).

O processo de neuroinflamação envolve uma interação complexa de respostas imunes dentro do sistema nervoso central (SNC). À medida que os indivíduos envelhecem, há uma progressiva desregulação do sistema imunológico, levando a um estado de inflamação crônica de baixo grau no cérebro. A ativação exacerbada das microgliais, as células imunes residentes do SNC, também podem contribuir com a inflamação central, pela liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Disabato *et al.*, 2016). Além disso, fatores como estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e acúmulo de proteínas mal dobradas exacerbam ainda mais os processos neuroinflamatórios. Essa neuroinflamação crônica tem sido implicada na patogênese de várias doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer e doença de Parkinson, contribuindo para o declínio cognitivo (Ameen *et al.*, 2022).

Em resposta a este quadro neuroinflamatório e de estresse oxidativo aumentado (Budni *et al.*, 2016), são observadas quedas nas concentrações de fatores de crescimento no hipocampo e córtex frontal, tais como BDNF, NGF e IGF-1

(Vedovelli *et al.*, 2017; Ameem *et al.*, 2022). O BDNF é a neurotrofina mais expressa no SNC, produzida pré-sinápticamente nos corpos celulares dos neurônios sensoriais dos cornos dorsais e no hipocampo, pelos dendritos pós-sinápticos. Ele é fundamental para o funcionamento adequado do cérebro, pela ativação do seu receptor tirosina quinase B (TRK β), promovendo o crescimento, a manutenção e a sobrevivência dos neurônios. Com o passar da idade, ocorre uma diminuição na produção de BDNF no líquido cefalorraquidiano e no hipocampo, acarretando redução no desempenho cognitivo, como na memória de curto prazo e memória espacial, na aprendizagem e no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Tapia-Arancibia *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Jc *et al.*, 2015; Trombetta *et al.*, 2020).

Embora as pesquisas sobre o envelhecimento tenham avançado consideravelmente nos últimos anos, a etiologia desse processo ainda não é completamente compreendida (López-Otín *et al.*, 2013). Portanto, compreender as alterações fisiológicas e funcionais decorrentes do envelhecimento, tem sido considerado de grande relevância clínica no nível mundial.

1.1 Modelos experimentais de envelhecimento

Na tentativa de compreender com mais profundidade (nos níveis celulares e moleculares) os mecanismos fisiológicos relacionados ao envelhecimento, modelos de envelhecimento têm sido desenvolvidos em laboratórios, utilizando principalmente roedores (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2017; Azman; Zakaria, 2019). Além de permitir a busca pela compreensão desses mecanismos, a pesquisa com modelos experimentais de envelhecimento tem se feito necessária devido à dificuldade de manter animais vivos por longos períodos em biotérios para o envelhecimento natural, bem como pelo alto custo financeiro e risco considerável de mortalidade dos animais (Cebe *et al.*, 2014).

Nesse sentido, são descritos na literatura modelos de animais com senescência acelerada 8 (SAMP8) (Takeda *et al.*, 1994), modelo animal de inibição do gene Klotho (Kuro-O *et al.*, 1997), e modelo animal com doença de Alzheimer utilizando injeção intracerebroventricular ou intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (Kamat *et al.*, 2015) e modelos de envelhecimento central (SNC) e periférico em ratos e camundongos induzidos pela injeção de D-galactose (Xu *et al.*, 1985; Sadigh-Eteghad *et al.*, 2017; Azman; Zakaria, 2019; Lin *et al.*, 2020).

A D-galactose é uma aldo-hexose, um açúcar redutor encontrado no organismo humano e em diversos lácteos, como leite, queijo e manteiga, além de estar presente em algumas frutas, como ameixa, figo e cereja (Acosta e Gross, 1995). Em um adulto saudável, a ingestão diária de galactose não deve exceder 50 gramas, sendo que a maior parte é metabolizada aproximadamente 8 horas após a ingestão (Morava *et al.*, 2014). Em roedores a D-GAL é metabolizada por meio de duas enzimas-chave: D-galactoquinase (GALK) e galactose-1-fosfato uridiltransferase (GALT) (Kaplan E Pesce, 1996). Os possíveis mecanismos subjacentes envolvidos no envelhecimento precoce em animais no modelo de injeção de D-GAL estão associados ao seu excesso no organismo, o que pode levar a uma sobrecarga enzimática na GALK e GALT (Wang, 1999).

A sobrecarga nessas enzimas resulta na formação de galactitol pela ação da enzima galactose redutase, que não pode ser metabolizado, resultando em estresse osmótico nas células, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) e disfunção mitocondrial (Wang, 1999). O excesso de D-galactose também pode ser convertido em aldose e peróxido de hidrogênio pela ação da enzima galactose oxidase, levando à redução dos níveis da enzima Superóxido Dismutase (SOD), que possui um potente efeito antioxidante, prejudicando a homeostase redox celular (Wu *et al.*, 2008). Além disso, o excesso de D GAL pode reagir com grupos amino de proteínas para formar o composto de base de Schiff e produtos Amadori, levando à formação de espécies avançadas de glicação (AGEs) que se ligam aos seus receptores RAGE, e à ativação da enzima NADPH oxidase (NOX) (Azman; Zakaria *et al.*, 2019). Em resumo, esses processos metabólicos resultam no aumento de espécies reativas de oxigênio, inflamação e aumento de radicais livres no cérebro (Perrone *et al.*, 2020; Yoo e Kim *et al.*, 2021).

A administração crônica de D-galactose em roedores pode provocar danos à memória dependente do hipocampo, com diminuição na concentração de BDNF (Chen *et al.*, 2016), aumento do estresse oxidativo pela produção exacerbada de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Budni *et al.*, 2016), e aumento da expressão das proteínas JNK (c-Jun N-terminal quinase), pertencente à família das MAPK (proteínas quinases ativadas por mitogênio) e o fator nuclear KB (NF-KB), que desempenham papel importante na liberação de citocinas inflamatórias, incluindo IL-6, IL1 β e TNF- α (Liu *et al.*, 2017).

Estudos anteriores mostraram aumento nas concentrações de citocinas inflamatórias, incluindo IL-6, IL-1 β e TNF- α no soro e hipocampo de roedores em decorrência da injeção de D-galactose na dose de 150 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ por oito (Duan *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2020) e dez semanas (Nan *et al.*, 2019).

Além das alterações descritas no SNC, têm sido também verificadas alterações em músculos esqueléticos após a injeção de D-Gal. A injeção intraperitoneal de D-galactose na dose de 150 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ por 6 semanas causou atrofia no músculo gastrocnêmio, observada pela redução significativa na relação entre a massa muscular (gastrocnêmio) e a massa corporal dos animais que receberam D GAL. Além disso, foi constatada no músculo gastrocnêmio dos ratos tratados com D-Gal, diminuição da área transversal e do diâmetro das fibras musculares quando comparados com ratos controle normais (Kou *et al.*, 2017).

Outros estudos utilizando o modelo com D-Galactose, verificaram danos às fibras musculoesqueléticas, atrofia e desequilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas musculares (Chang *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2017).

Embora alguns efeitos da injeção crônica de D GAL em roedores estejam bem estabelecidos na literatura, existem controvérsias quanto a ação deletéria da D-galactose no SNC, principalmente no que diz respeito a diferentes doses usadas, em respostas relacionadas à plasticidade neural e à função cognitiva. Se por uma lado, a injeção intraperitoneal de D-galactose nas doses de 150 e 300 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ por 8 semanas não afetou, respectivamente, a memória de reconhecimento de objetos e a neurogênese e a memória espacial em ratos (Tikhonova *et al.*, 2014 ; Cardoso *et al.*, 2015), estudos mais recentes mostraram resultados diferentes. Xiong *et al* (2023) observaram que camundongos que receberam 500 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de D-Gal de injeção intraperitoneal por 10 semanas apresentaram diminuição na neurogênese hipocampal e redução na memória de reconhecimento de objetos. Resultados semelhantes aos de Xiong et al (2023) sobre a memória e neurogênese haviam sido encontrados anteriormente, em estudo com ratos que receberam injeção diária de d D-Gal na dose de 50 mg⁻¹.kg⁻¹.dia⁻¹, durante 8 semanas (Saenno *et al.*, 2022).

Além dos efeitos da administração crônica de D-Gal sobre a memória, estudos em roedores tem mostrado que a capacidade de exercício voluntária em roda apresenta diminuição em animais que receberam 60 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de D-GAL por 90 dias (Belviranli M, Okudan N, 2019). Em outro estudo a capacidade de exercício voluntário em roda na dose de 200 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de D-GAL por 10 semanas

não foi alterada (Lee *et al.*, 2019). Na dosagem de $150 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de D-GAL intraperitoneal, similar ao nosso estudo houve diminuição no desempenho motor avaliado pelo teste labirinto aquático de Morris quando comparado ao grupo D-Gal que realizou exercício intermitente de intensidade moderada por 45 min/dia, 5 dias por semana, durante 6 semanas (Zhang *et al.*, 2023). Entretanto nenhum dos estudos citados avaliaram a capacidade oxidativa máxima desses animais.

Embora as pesquisas apresentem que a capacidade de realização de exercício é diminuída ou não se altera, por sua vez, a avaliação do desempenho físico aeróbico máximo em animais submetidos ao envelhecimento por D-Gal é escassa.

1.2 Exercício físico e envelhecimento

Intervenções não farmacológicas de baixo custo, incluindo o exercício físico têm sido amplamente recomendadas para tentar mitigar os efeitos deletérios relacionados ao processo de envelhecimento nos seres humanos (Garatachea *et al.*, 2015).

O aumento da capacidade aeróbica, tendo como um dos marcadores o aumento no VO_2 pico associado a uma maior capacidade oxidativa muscular é considerado um fator importante para atenuar o risco de desenvolvimento de diversas doenças relacionadas ao envelhecimento, dentre elas as cardiometabólicas e as neurodegenerativas (Betik;Hepple, 2008; Sheppard *et al.*, 2009; Garatachea *et al.*, 2015; Pandey *et al.*, 2020). Em roedores, o treinamento aeróbico de natação de intensidade moderada mitigou os efeitos deletérios da administração de D-gal por oito semanas, pela ativação das vias de sinalização de sobrevivência celular IGF1R/PI3K/AKT e AMPK/SIRT1 e pela inibição do fator nuclear NF- $\text{K}\beta$, da enzima ciclooxigenase-2 (COX2) que está envolvida no aumento da inflamação em diversos tecidos (Lin *et al.*, 2020).

O aumento da força muscular pelo treinamento de força de moderada intensidade, pode atenuar o declínio cognitivo relacionado à idade, e tem sido recomendado para o público idoso por elevar as concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) no hipocampo. Desta maneira, haverá aumento da sinalização hipocampal da via IGF-1 / IGF-1R/ AKT, induzindo a expressão das fosfoproteínas sinapsina 1 e sinaptofisina, essenciais na

transmissão sináptica e liberação de neurotransmissores, o que pode contribuir para melhorar o aprendizado e a memória (Cassilhas *et al.*, 2010; Cassilhas *et al.*, 2012).

A combinação dos treinamentos aeróbico e de força, comumente chamado treinamento combinado (TC) tem sido postulada como uma estratégia eficiente para atenuar a perda da capacidade funcional em idosos (Cadore *et al.*, 2011; Izquierdo *et al.*, 2021). Estudos têm demonstrado que o TC por oito semanas promoveu efeitos positivos sobre os perfis metabólico e imunológico em modelos experimentais de síndrome metabólica e menopausa (Conti *et al.*, 2015) e hipertensão (Dias *et al.*, 2020). Trabalho anterior de nosso grupo mostrou, em indivíduos de meia idade e idosos de ambos os sexos com diabetes tipo 2 (DM2), que 8 semanas de TC reverteu parcialmente os efeitos negativos do DM2 em domínios cognitivos específicos, por melhoria da regulação metabólica destes indivíduos (Silveira-Rodrigues *et al.*, 2021). Em um modelo animal de Alzheimer (induzido pela injeção de 100 mg.kg⁻¹.dia⁻¹ de D Gal por 42 dias), o TC por 6 semanas melhorou a memória de trabalho de curto prazo pela ativação da via da neurotrofina IGF-1 que pode atravessar a barreira hematoencefálica, e também aumento do fator de crescimento nervoso (NGF) e diminuição da peroxidação lipídica no hipocampo de ratas Wistar ovariectomizadas (Ozbeylli *et al.*, 2017).

A prática regular e supervisionada de exercício físico aeróbico de intensidade moderada, na maioria dos dias da semana, associada à realização de pelo menos duas sessões semanais de exercício de força, tem sido sugerida como eficaz em promover benefícios na saúde geral de idosos (Izquierdo *et al.*, 2021; Heisz; Waddington, 2024).

1.3 Suplementação de flavonóis do cacau e envelhecimento

Intervenções nutricionais têm demonstrado eficácia no controle de déficits cognitivos e periféricos em pessoas idosas (Ayaz *et al.*, 2019). Dietas ricas em polifenóis, especialmente em flavonóis encontrados em frutas e vegetais, como no vinho tinto, chá verde, nozes e cacau, têm sido capazes de prevenir doenças neurodegenerativas e metabólicas, devido ao seu potencial antioxidante e anti-inflamatório (Spencer *et al.*, 2010; Brickham *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2018).

Os polifenóis são encontrados em abundância nas sementes de cacau, sendo os monômeros (+) -catequina e a (-) -epicatequina os flavonóis mais

presentes no fruto, considerados os principais compostos bioativos com benefícios para a saúde (Efraim; Alves; Jardim, 2011; Prakash *et al.*, 2019).

A suplementação de flavonol do cacau tem ação sobre diferentes sistemas fisiológicos. Induz vasodilatação dependente do endotélio, através do aumento na produção de óxido nítrico (NO), (Garcia – Yu *et al.*, 2020; Heiss *et al.*, 2003; Decroix *et al.*, 2018) produzindo, dentre outros, aumento do fluxo sanguíneo cerebral em idosos (Brickham *et al.*, 2014). No SNC, foram também reportadas outras ações importantes da suplementação dos flavonóis do cacau: Aumento da ação antioxidante (Fernandez-Millan *et al.*, 2015), aumento da angiogênese, neurogênese e sinaptogênese (Vanzour *et al.*, 2008), diminuição da expressão de marcadores inflamatórios (Suen *et al.*, 2016), apoptose celular e espécies reativas de oxigênio (EROS) (Cooper *et al.*, 2008; Sokolov *et al.*, 2013).

No músculo esquelético, foi apontado recentemente, que o monômero epicatequina, principal substância bioativa do cacau, parece promover a diferenciação do músculo esquelético bem como a neutralização das vias que participam na degradação das proteínas (German *et al.*, 2024). Além disso a suplementação de flavonol do cacau por 15 dias levou a melhorias na função mitocondrial em músculos oxidativos e glicolíticos de camundongos saudáveis, resultante de um aumento na massa mitocondrial apesar da manutenção, no nível celular, da produção de ROS, sugerindo adaptações qualitativas dentro das mitocôndrias (Daussin *et al.*, 2022). O consumo de flavonoides do cacau a longo prazo pode promover o aumento do fluxo sanguíneo no giro dentado do hipocampo e, conseqüente na melhora da memória em idosos (Brickham *et al.*, 2014). Em ratos Wistar idosos, foi demonstrado que a ingestão de $24 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de extrato polifenólico de cacau por 12 meses melhorou o desempenho cognitivo da memória, elevou a expectativa de vida em 11% e aumentou os níveis dopaminérgicos na urina (Bisson *et al.*, 2008). Outro estudo em ratos Sprague-Dawley mostrou diminuição do estresse oxidativo no cérebro de ratos envelhecidos por D Gal, após uma dieta com 10% e 16% de cacau por oito semanas (Yoo e Kim *et al.*, 2021). Em nosso laboratório, ratos com 8 semanas de idade resistentes a insulina, recebendo a suplementação de $45 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de extrato polifenólico de cacau associada ao treinamento aeróbico em esteira por 30 minutos, durante oito semanas, tiveram atenuação no ganho de massa corporal, melhora nos perfis glicêmico, e lipídico e

diminuição do status inflamatório no fígado, pâncreas, tecido adiposo e músculo esquelético (Melo *et al.*, 2022).

Embora a suplementação com flavonóis do cacau e o treinamento físico possam acarretar diversos benefícios relacionados à saúde, os efeitos sinérgicos destas duas intervenções crônicas sobre os parâmetros cognitivos, o desempenho físico e os parâmetros imunoquímicos associados ao envelhecimento experimental ainda foram pouco investigados.

Portanto, mais estudos são necessários para elucidar os efeitos isolados e/ou associados da suplementação dos flavonóis do cacau e do treinamento combinado sobre o envelhecimento, bem como os potenciais mecanismos fisiológicos e moleculares subjacentes a estes possíveis efeitos.

2 OBJETIVOS GERAIS

Verificar os efeitos isolados e/ou associados do treinamento físico aeróbico e de força e da suplementação de flavonóis do cacau sobre o desempenho físico, memória, respostas neurotróficas de BDNF, imunoquímicas, e parâmetros de estresse oxidativo em ratos induzidos ao modelo experimental de envelhecimento por D-galactose.

2.1 Objetivos específicos

Para alcançar os objetivos gerais desta tese, dividimos o trabalho em dois estudos, cada qual com seus objetivos específicos:

Estudo 1: Efeitos do envelhecimento, no desempenho físico, na memória, perfil inflamatório e estresse oxidativo em ratos.

Analisar os impactos causados pela administração de D-galactose em ratos sobre:

- 1) As variáveis de desempenho físico consumo pico de oxigênio, tempo total de exercício, velocidade pico, trabalho realizado e força muscular;
- 2) As memórias de curto (60 minutos) e longo prazo (24 horas)
- 3) Os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , IL-10, TNF) e de marcadores de estresse oxidativo (TBARS e Hidroperóxidos de lipídios) no hipocampo, córtex frontal e músculos sóleo e EDL.

Estudo 2: Treinamento físico e suplementação de flavonóis de cacau: Impactos no desempenho físico, memória e respostas neurotróficas, imunoquímicas e de estresse oxidativo em um modelo experimental de envelhecimento por D-galactose.

Verificar os efeitos isolados e/ou associados do treinamento físico e da suplementação de flavonóis do cacau em ratos submetidos a um protocolo de envelhecimento sobre:

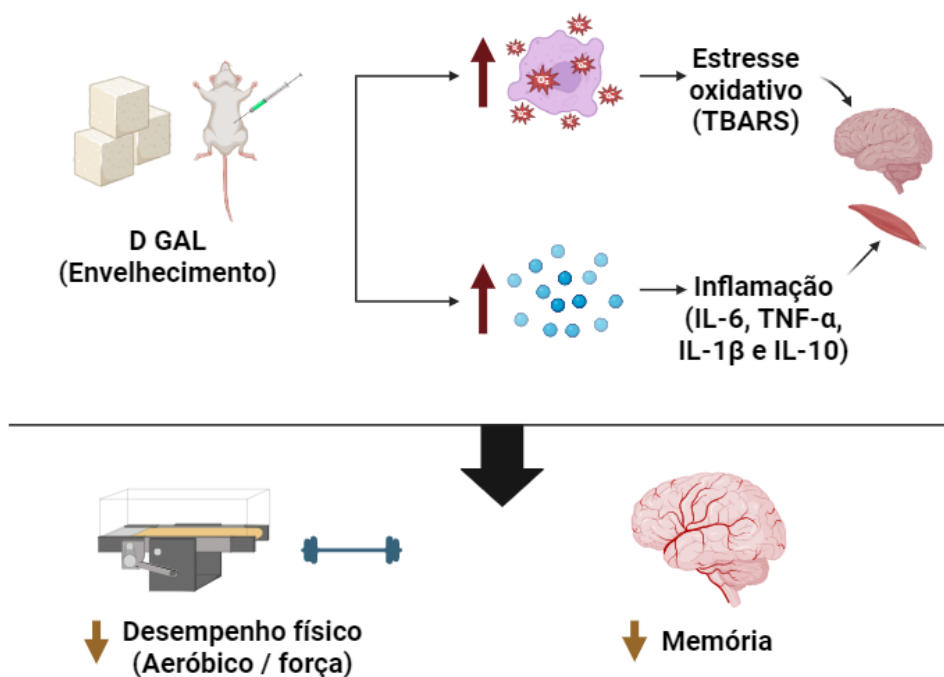
- 1) O desempenho aeróbico e de força muscular (tempo total de exercício, velocidade pico, trabalho realizado e força muscular)
- 2) As memórias de curto (60 minutos) e longo prazo (24 horas)
- 3) Os níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , IL-10 e TNF- α), do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo, córtex frontal e músculo sóleo.

2.2 Hipóteses

Estudo 1:

A administração de 150 mg. kg⁻¹.dia⁻¹ de D-Galactose (D-GAL) por oito semanas via injeção intraperitoneal irá promover em ratos Wistar de 8 semanas de idade aumento de marcadores imunoquímicos e de parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo, córtex frontal e músculo esquelético, além de diminuir o desempenho físico aeróbico, da força muscular e causar déficit na memória de curto e longo prazo (Figura 1).

Figura 1 - Hipóteses do estudo 1

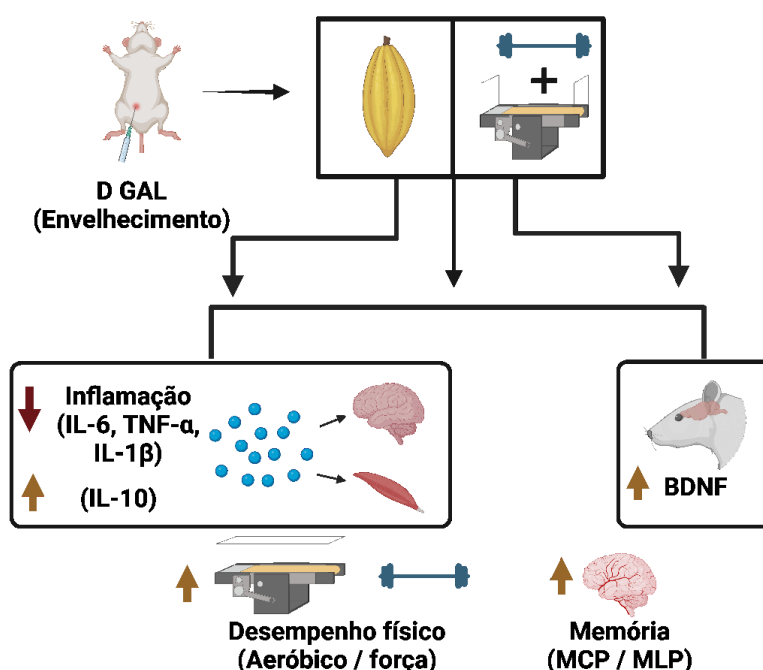


Fonte: Próprio autor.

Estudo 2:

1. O treinamento físico, associado à suplementação de flavonóis do cacau, aumentará o desempenho físico aeróbico e de força em ratos induzidos experimentalmente ao envelhecimento.
2. O treinamento físico, associado à suplementação de flavonóis do cacau, atenuará a concentração de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 β e TNF- α) e aumentará a concentração da citocina anti-inflamatória (IL-10) no hipocampo, córtex frontal e no músculo sóleo, bem como os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo e córtex frontal, além de promover a melhora da memória de curto e longo prazo em ratos induzidos experimentalmente ao envelhecimento.
3. A suplementação crônica de flavonóis do cacau promoverá efeitos de maior magnitude quando associada ao treinamento físico, tanto no desempenho físico aeróbico e de força quanto na atenuação de citocinas inflamatórias e aumento da citocina anti-inflamatória no hipocampo, córtex frontal e no músculo sóleo, além de elevar os níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo e córtex frontal, promovendo também a melhora da memória de curto e longo prazo em ratos induzidos experimentalmente ao envelhecimento (Figura 2).

Figura 2 - Hipóteses do estudo 2



Uma vez estabelecidos os objetivos específicos, bem como as nossas hipóteses para cada um dos dois estudos realizados, passaremos a apresentar agora, para cada estudo, os métodos utilizados para testar nossas hipóteses, os resultados obtidos com sua respectiva discussão.

3 ESTUDO 1 – Efeitos do envelhecimento no desempenho físico, na memória, perfil inflamatório e estresse oxidativo em ratos

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1 Animais e cuidados éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFMG, protocolo nº 161/2020 – Anexo A) e conduzido de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e pelo Guia dos National Institutes of Health (Publicações NIH Nº 8023, revisado em 1978). Utilizamos para esse estudo 30 ratos Wistar machos, com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Foram fornecidos água e ração padrão livremente durante todo o período experimental. O ambiente foi mantido sob controle, seguindo um ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com temperatura constante em $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

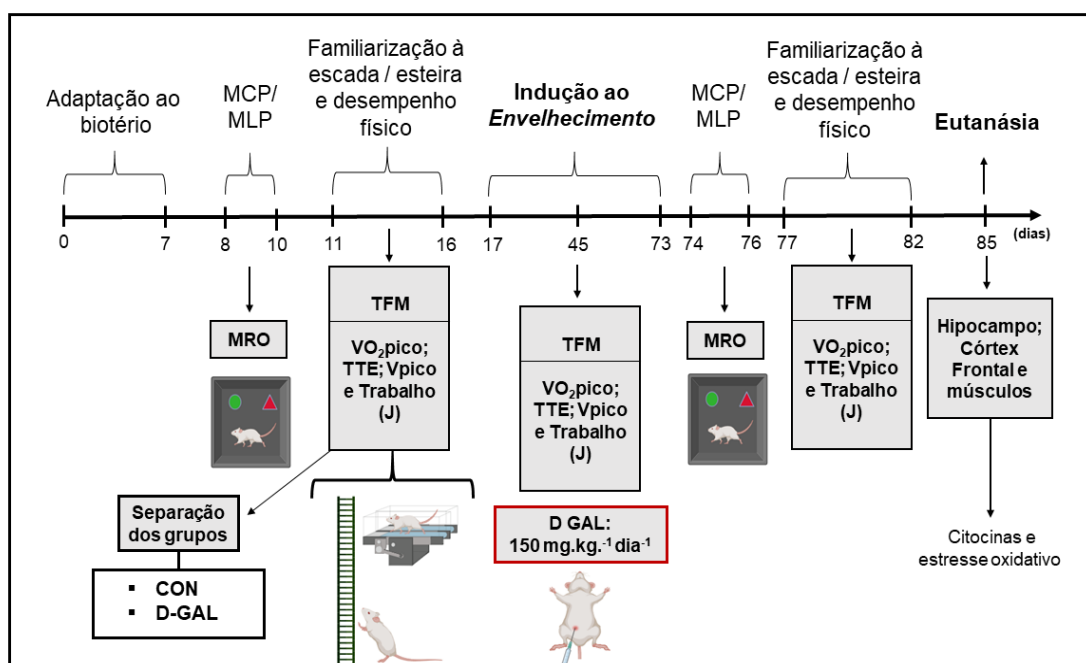
3.1.2 Delineamento experimental

Os ratos foram habituados ao ambiente laboratorial por sete dias e distribuídos em dois grupos experimentais, balanceados pela massa corporal (n=15 por grupo): Controle (CON) e D-galactose (D-GAL) para indução de envelhecimento. Em seguida, ambos os grupos foram submetidos ao Teste de Reconhecimento de Objetos (MRO), para avaliação das memórias de curto e longo prazo, por três dias consecutivos. Posteriormente, foram familiarizados com a escalada em escada vertical, para futura avaliação da força muscular, durante três dias e com a corrida em esteira rolante, para avaliação posterior do desempenho aeróbico, por cinco dias consecutivos.

Vinte e quatro horas após a familiarização à escada e esteira, os animais foram submetidos ao teste de força máxima (TFM) e ao teste incremental de corrida para avaliação, respectivamente, do desempenho físico de força e aeróbio. Os grupos foram equilibrados com base no desempenho aeróbio e de força muscular. Em seguida, o grupo D GAL foi submetido a um protocolo de oito semanas de indução ao envelhecimento, através da administração intraperitoneal de D-galactose, enquanto o grupo CON recebeu, pela mesma via, apenas solução salina

0,9%. Ao final da quarta semana do protocolo de envelhecimento, os animais foram novamente submetidos aos testes de força na escada e incremental na esteira para avaliar o desempenho físico ao longo dos 28 dias de intervenção com D-galactose. Concluído o protocolo de envelhecimento (8 semanas), ambos os grupos foram submetidos novamente ao teste MRO, familiarização com a escada e esteira, e avaliação do desempenho físico para investigar os efeitos da D-galactose, sobre os parâmetros avaliados, para verificar se o quadro clínico de envelhecimento descrito na literatura, decorrente do modelo de envelhecimento com D-GAL havia se estabelecido. Os animais foram eutanasiados 48 horas após o fim da sessão experimental. Os tecidos do hipocampo, córtex frontal e músculos sóleo e EDL foram coletados e armazenados para análises posteriores. Todos os procedimentos foram realizados entre 08:00 e 17:00 horas. A Figura 3 apresenta o delineamento experimental do estudo.

Figura 3 – Delineamento experimental do estudo 1. MRO: Teste de reconhecimento de objetos novos; MCP: Memória de curto prazo; MLP: Memória de longo prazo; TFM: Teste de força máxima; VO₂pico: Volume de oxigenação pico; TTE: Tempo total de exercício; Trabalho (J): Trabalho em joule; D GAL: D-Galactose; CON: Grupo controle; D-GAL: Grupo D Galactose.



Fonte: Próprio autor

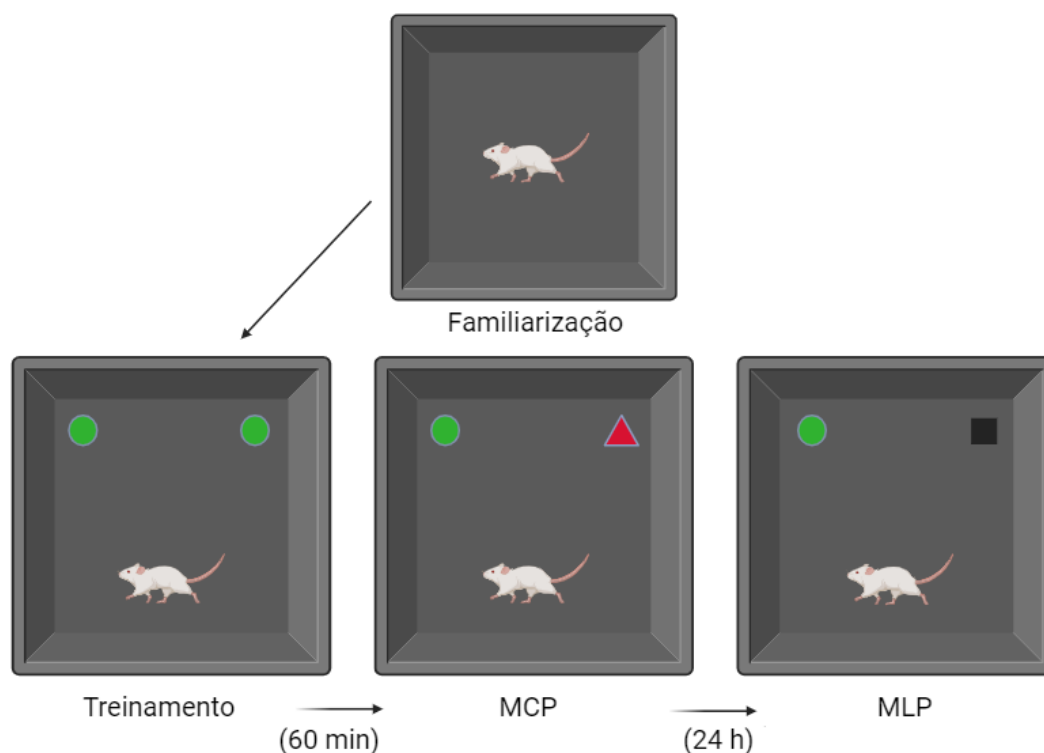
3.1.3 Indução ao envelhecimento

As alterações tipo envelhecimento foram induzidas por meio da administração de 150 mg/kg/dia de D-galactose (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA, G0750), diluída em solução salina a 0,9%, (100 mg.mL⁻¹), aplicada via injeção intraperitoneal durante 8 semanas (Lin *et al.*, 2020).

3.1.3.1 Memória de reconhecimento

As memórias de curto e longo prazo foram avaliadas por meio do teste de reconhecimento de objetos (MRO). No primeiro dia, os ratos foram colocados no centro de uma caixa de madeira (70 cm x 70 cm - comprimento x 40 cm - altura) por 5 minutos sem a presença de objetos para a familiarização ao ambiente. No segundo dia, durante a fase de treinamento, dois objetos iguais (A) (Garrafa de vidro) foram colocados paralelamente nas extremidades da caixa (7,5 cm de distância das paredes) para livre exploração por 10 minutos. Sessenta minutos após o treinamento, a avaliação da memória de curto prazo (MCP) foi realizada por 5 minutos, com um novo objeto (B) (Lego) substituindo um objeto familiar (A). No terceiro dia, a memória de longo prazo (MLP) foi avaliada por 5 minutos, utilizando um novo objeto (C) (Garrafa plástica) no lugar do objeto (B). No segundo e terceiro dia do teste, os animais foram posicionados inicialmente na extremidade oposta à dos objetos com a cabeça voltada para a parede. A cada avaliação, a arena e os objetos foram limpos com álcool 70% para evitar pistas olfativas (Bevins; Besheer, 2006; Crunfli *et al.*, 2019) (Figura 4).

Figura 4 – Etapas do Teste de Reconhecimento de Objetos para a avaliação da memória de curto (MCP) e longo (MLP) prazo



Fonte: Próprio autor

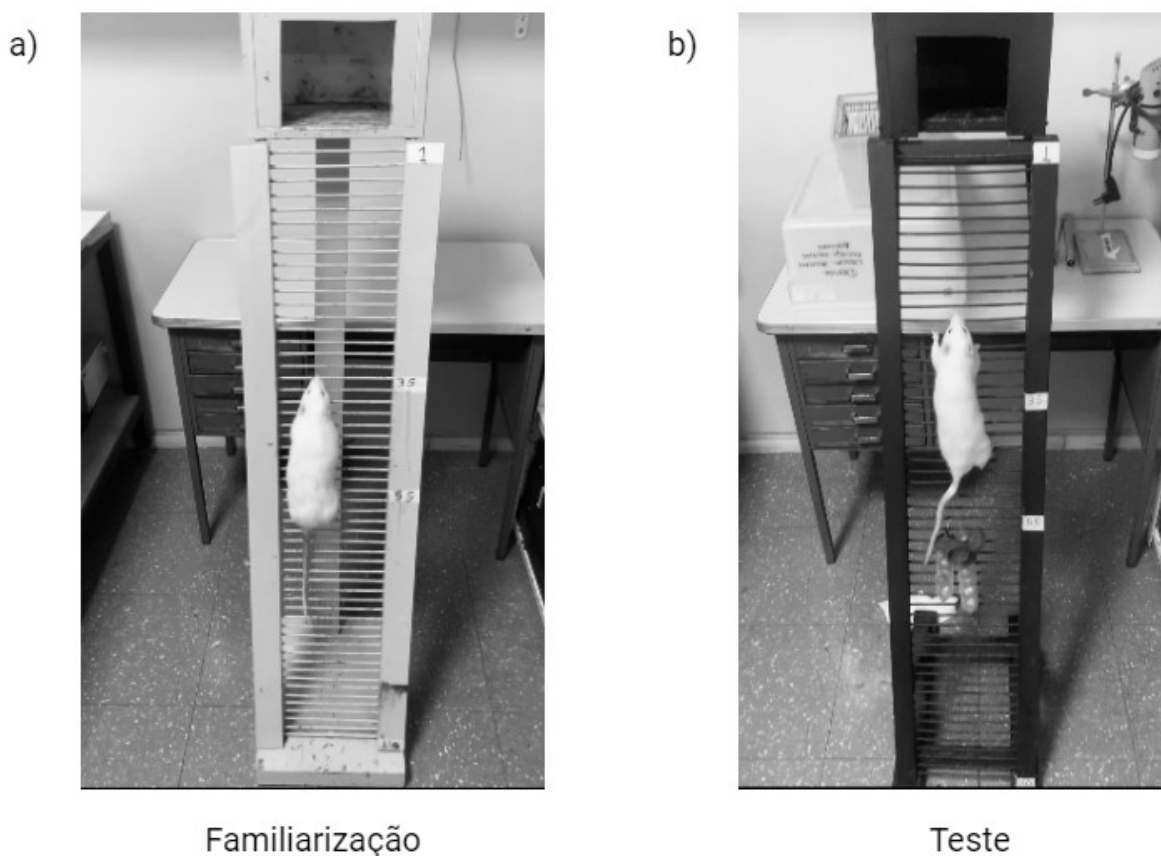
O software Any Maze foi utilizado para a análise dos resultados (ANY maze Vídeo Tracking System 7.16; STOELTING CO. ©, 2022). Foi calculado o índice de reconhecimento de objetos, que consiste no tempo gasto pelo o rato para explorar o novo objeto dividido pela soma da exploração do objeto novo e do objeto familiar (Bevins; Besheer, 2006; Rojas *et al.*, 2013).

3.1.4 Desempenho de força muscular

Os ratos foram familiarizados a escalada em uma escada vertical (1,1 m × 0,18 m, 2 cm de grade, inclinação 80°) por três dias consecutivos. Inicialmente os ratos foram mantidos por 60 segundos na câmara de alojamento, e em seguida colocados na escada a 35 cm, 55 cm e 110 cm de distância até o topo. A cada tentativa os animais permaneceram na câmara de alojamento por 60 segundos (Figura 5a).

O teste de carga máxima consistiu na subida inicial do animal com uma carga correspondente a 75% da massa corporal fixada na parte proximal da cauda, em tubos Falcon de 50 mL com pesos de pescaria acoplados a cabo de aço revestido de plástico fixados por uma fita de borracha (Scotch 3 M). A cada escalada bem-sucedida o animal permaneceu na caixa de alojamento da escada por 60 segundos e um peso adicional de 30 gramas foi adicionado. A falha foi determinada quando o animal não conseguiu continuar a subida mesmo depois de 3 estímulos suaves sucessivos na cauda (Gomes *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2022) (Figura 5b). A análise dos resultados foi realizada utilizando a carga máxima relativa utilizando a seguinte equação CM/MC : onde CM é a carga máxima obtida no teste de força e MC, a massa corporal do animal em quilogramas.

Figura 5 – Etapas do Teste de Força máxima muscular em escada vertical: a) familiarização; b) Teste de força máxima



Fonte: Próprio autor

3.1.5 Capacidade aeróbica máxima e desempenho aeróbico

O protocolo de familiarização a corrida em esteira rolante (Panlab/Havard Apparatus, Cornella Spain) foi realizado durante cinco dias consecutivos por 5 minutos diários a uma velocidade incremental ajustada a cada minuto (10, 10, 11, 13 e 15 m.min⁻¹) com inclinação em 5% e estímulo elétrico fixado em 0,28 mA (Prímola-Gomes *et al.*, 2009).

O teste incremental de corrida em esteira (Panlab/Harvard Apparatus) foi iniciado na velocidade de 10 m.min⁻¹, com incrementos progressivos em 1 m. min⁻¹ a cada 3 minutos. A inclinação e a estimulação elétrica foram semelhantes ao protocolo de familiarização. O teste foi interrompido quando o animal permaneceu na grade de estimulação elétrica por 10 segundos. O consumo de oxigênio pico (VO_{2pico}) foi analisado por meio de calorimetria indireta de fluxo aberto (Gas Analyzer Panlab/Havard Apparatus, Cornella Spain). O desempenho aeróbico foi avaliado pelo VO_{2peak}, tempo total de exercício (TTE), velocidade pico (V_{pico}) e trabalho total (J). Foram considerados para análise os maiores valores obtidos de VO_{2pico} e V_{pico} durante o teste incremental. A V_{pico} foi calculada utilizando a seguinte equação: $V_{pico} = v + (t/180)$, onde v é a velocidade em (m.min⁻¹) do último estágio completo; t = tempo em segundos do último estágio incompleto. O trabalho total foi calculado utilizando a equação: $\text{Trabalho (Joules)} = mc \times g \times v \times \sin \theta \times t$, onde MC é a massa corporal do animal em quilogramas; g : A aceleração da gravidade (9,8 m.s⁻²); v : A velocidade da esteira em metros por minuto; $\sin \theta$: O ângulo de inclinação da esteira (5°) e t : O tempo gasto em cada estágio em minutos (Soares *et al.*, 2019).

3.1.6 Eutanásia, índice de adiposidade e massa muscular

Os ratos foram submetidos à eutanásia por meio de decapitação em guilhotina, sem sedação prévia, 48 horas após a última sessão de teste incremental. Os tecidos hipocampo e córtex frontal foram selecionados, por serem áreas do SNC relacionadas ao aprendizado e memória. O músculo sóleo e EDL com predominância de fibras oxidativas e glicolíticas, respectivamente foram escolhidos devido a avaliação do desempenho físico. Todos os tecidos citados foram removidos e congelados em nitrogênio e em seguida armazenados a -80 °C para análises posteriores. Os tecidos musculares e adiposos retroperitoneal (TAR), mesentérico

(TAM) e epididimal (TAE) foram pesados em uma balança (SHIMADZU® Modelo BL320H, precisão de 0,001g) para a determinação do índice de adiposidade (IA), utilizando a seguinte equação: Índice de adiposidade = (TAR + TAM + TAE) / MC x 100. Para verificar a massa muscular foi utilizado a seguinte equação: (Massa muscular / Massa corporal total).

3.1.7 *Parâmetros de estresse oxidativo*

Foram retirados aproximadamente 50mg de cada órgão (Hipocampo, córtex Frontal, músculos EDL e sóleo) para a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo. Os fragmentos foram homogeneizados com PBS 1x gelado e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi separado para as análises.

3.1.8 *Avaliação da peroxidação lipídica por substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)*

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são amplamente utilizadas como biomarcadores para peroxidação lipídica, importante marcador do dano oxidativo. Concentrações elevadas de TBARS indicam aumento da peroxidação lipídica, que ocorre quando espécies reativas de oxigênio (ROS) atacam ácidos graxos saturados nas membranas celulares, levando à formação de peróxidos lipídicos. (De Leon & Borges, 2022).

A análise da medida dos metabólitos reativos ao ácido tiobarbitúrico foi realizada a partir da adição de solução contendo ácido tricloroacético (TCA 15%), ácido tiobarbitúrico (TBA 0,0375%) e ácido clorídrico (HCl 0,25 N) aos sobrenadantes dos órgãos. As amostras foram mantidas em banho-maria fervente por 15 minutos e posteriormente resfriadas. Após a adição de álcool butílico os tubos foram vigorosamente agitados. As amostras foram centrifugadas a 3.000rpm por 10 minutos. Foram adicionados à placa de 96 poços 200µL do sobrenadante. A absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 535nm, e os resultados foram normalizados pela concentração de proteína no hipocampo, córtex pré-frontal, fígado e músculos Sóleo e Edl (Lowry *et al.*, 1951).

3.1.9 Avaliação da concentração de hidroperóxidos

A avaliação das concentrações de hidroperóxidos é crucial na análise do estresse oxidativo, pois os hidroperóxidos, incluindo o peróxido de hidrogênio, são intermediários-chave em reações oxidativas dentro dos sistemas biológicos. Níveis elevados de hidroperóxidos indicam um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e os mecanismos de defesa antioxidantes, levando ao estresse oxidativo.

Para a avaliação da concentração de hidroperóxidos, o ensaio foi realizado com uma parte da solução preparada pela dissolução do xilenol laranja e do sulfato ferroso amoniacal em H₂SO₄ diluída em solução de metanol contendo BHT (hidroxitolueno butilado). Para as dosagens, os sobrenadantes dos órgãos (20µL cada) foram acrescentados 180µL da solução citada, diretamente na microplaca, em triplicata. O branco foi alcançado pela utilização de tampão fosfato no lugar do sobrenadante. Em seguida as amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos, e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 560nm. A concentração de hidroperóxidos foi estimada pelo coeficiente de extinção de hidroperóxidos, $4,3 \times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, e pelo coeficiente de extinção do cromóforo azularroxado produzido pelo xilenol, ao se ligar aos íons férricos, $1,5 \times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. A quantificação dos hidroperóxidos da amostra foi alcançada sem TPP e o resultado foi normalizado pela concentração de proteína de cada fragmento (Lowry *et al.*, 1951).

3.1.9.1 Dosagem de Proteína

A dosagem da concentração de proteína no soro foi feita de acordo com Lowry *et al.* (1951). Para isso, em 250µL de amostra diluída (1:50) foram adicionados 250µL da solução contendo uma parte de sulfato de cobre, uma parte de tartarato de sódio e 100 partes de carbonato de sódio. Ainda, foram adicionados 25µL de reagente de Folin-Ciocalteu diluído (1:2). Em seguida as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras (200µL) foram então adicionadas à placa de 96 poços e a absorbância foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda de 660nm.

3.1.9.2 Citocinas pró e anti-inflamatórias

Os níveis de interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 1 β (IL-1 β) e do fator de necrose tumoral (TNF- α) foram avaliadas no hipocampo e córtex frontal por meio de ELISA (Melo *et al.*, 2022) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA; DuoSet kits DY506, DY522, DY501, e DY510, respectivamente). Todas as análises foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante.

3.1.10 Análise estatística

A normalidade e a homocedasticidade dos resíduos foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene respectivamente. Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. As variáveis de desempenho aeróbico, de força muscular máxima e de memórias de curto e longo prazo, foram comparadas pelo teste ANOVA two way mista, considerando os fatores grupos (CON vs. D GAL) e tempo (pré vs. 4ª semana vs. 8ª semana). Quando encontradas diferenças significativas foi realizado o post hoc de Bonferroni e/ou teste T de Student, considerando a média do coeficiente de variação dos dois grupos (CON vs. D GAL) nos três tempos experimentais (Sampaio, 2007). Para comparar os valores de composição corporal, concentração de citocinas e marcadores de estresse oxidativo entre os grupos (CON vs. D GAL) foi utilizado o teste T de Student. O teste de Pearson foi utilizado para investigar as correlações entre as concentrações de estresse oxidativo, citocinas e sua associação com o desempenho aeróbico e com as memórias de curto e longo prazo. Todas as análises foram realizadas no software R. (versão 4.2.2, USA) com interface Rstudio (versão 2023.06 + 421) O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

3.2 RESULTADOS

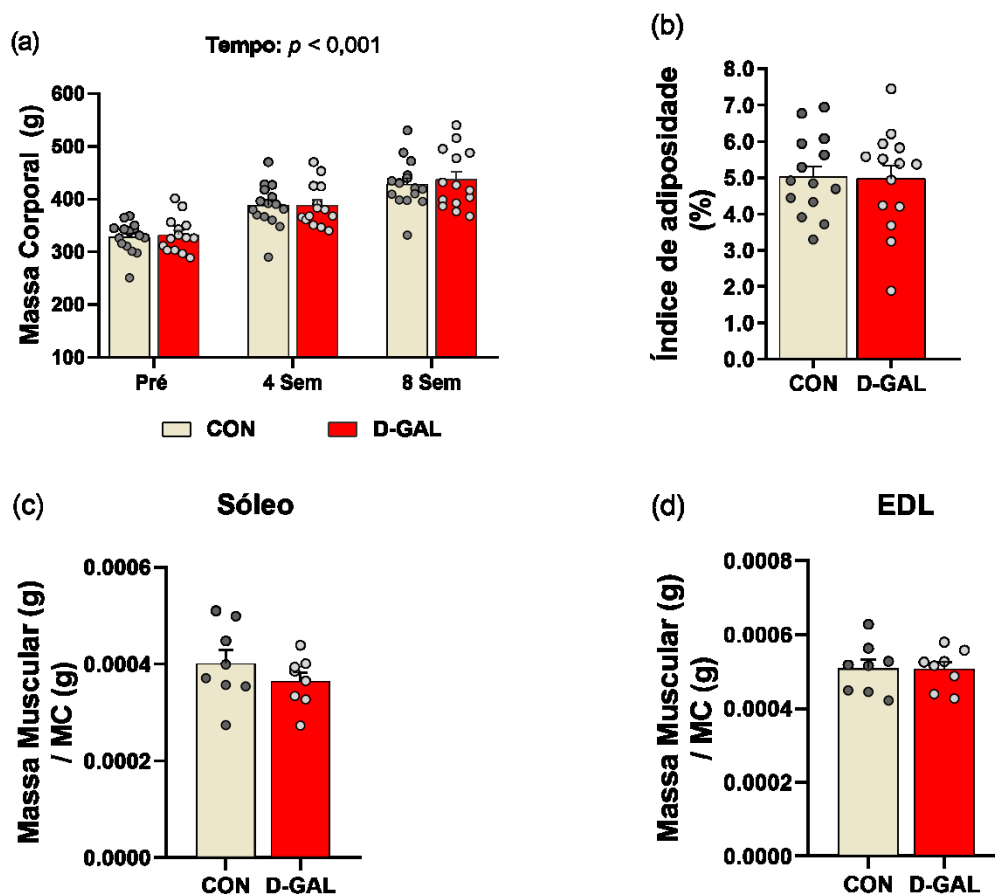
3.2.1 Composição corporal e índice de adiposidade

A massa corporal total aumentou de forma semelhante nos grupos controle (CON) e D-Galactose (D-GAL) na 4ª semana e após 8ª semanas de

intervenção ($F_{2,54} = 445,55$; $p < 0,001$) (Figura 6a). Quando comparados ao período pré intervenção. Quando comparado com o grupo CON, a administração de D-GAL não alterou o índice de adiposidade ($4,96 \pm 0,37$ vs. $5,03 \pm 0,27$ %; $t(27) = 0,15$; $p = 0,880$; Figura 6b), a massa muscular do sóleo ($0,01 \pm 0,01$ vs. $0,01 \pm 0,01$ g; $t(14) = 1,089$; $p = 0,294$; Figura 6c), e massa muscular do EDL ($0,01 \pm 0,01$ vs. $0,01 \pm 0,01$ g; $t(14) = 0,032$; $p = 0,974$, Figura 6d).

Figura 6 – Massa corporal (Pré e após 8 semanas de intervenção), índice de adiposidade e massa muscular relativa após 8 semanas de D-Galactose.

a) Massa corporal; b) Índice de adiposidade, c) Massa muscular (Sóleo) e d) Massa muscular (EDL). Média $\pm$ EPM. Anova two way mista para massa corporal. Teste T de Student para índice de adiposidade e massa muscular. Grupos: CON (n = 15); D-GAL (n = 14) para massa corporal e índice de adiposidade; CON (n = 8); D-GAL (n = 8) para massa muscular (Sóleo e EDL).



Fonte: Próprio autor

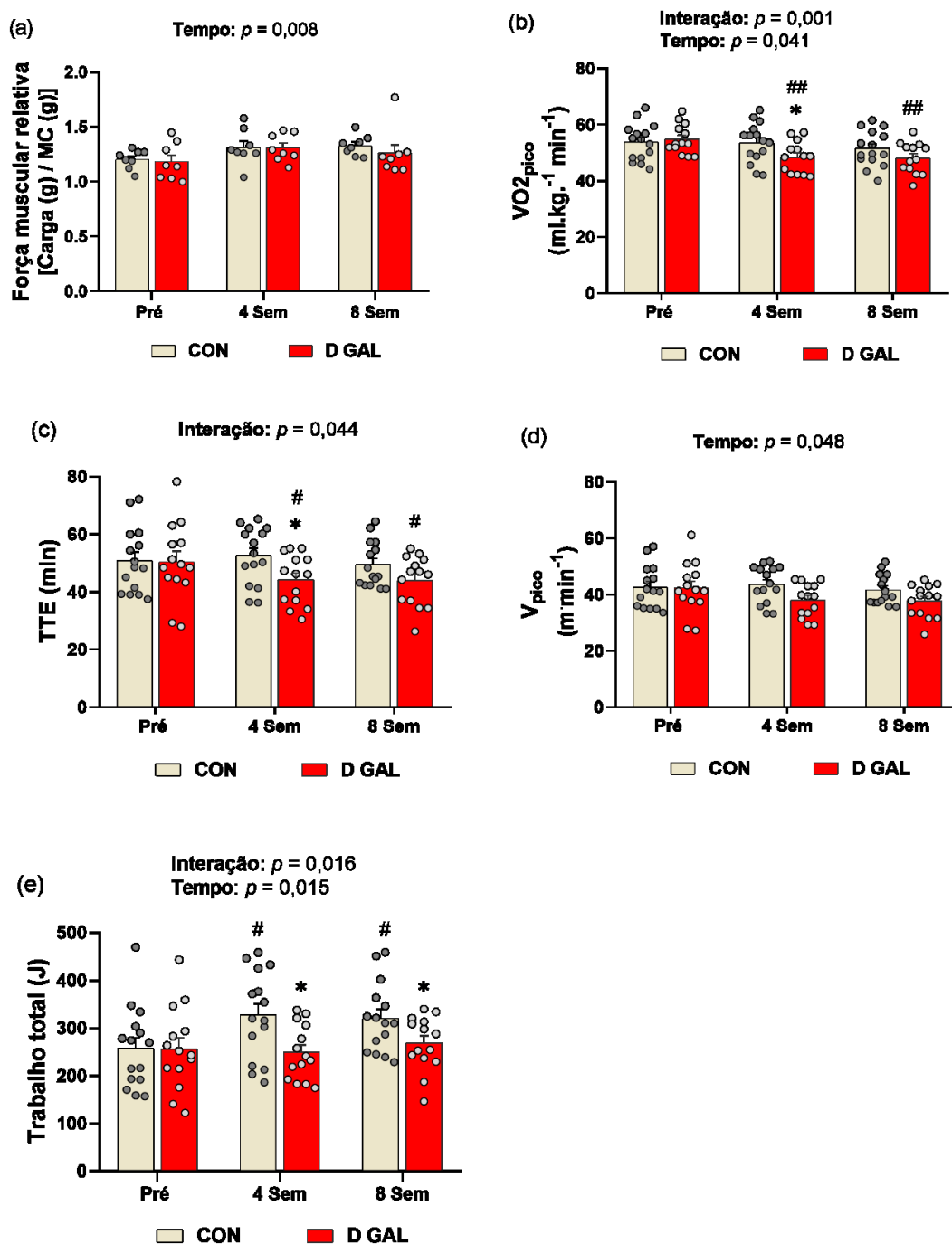
3.2.2 Desempenho físico

A força muscular relativa aumentou ($F_{2,28} = 5,70$; $p = 0,008$) de forma semelhante nos grupos CON e D-GAL na 4ª e após a 8ª semana de intervenção (Figura 7a). A administração de D-Galactose (D-GAL) reduziu a capacidade aeróbica e atenuou o trabalho total após 8 semanas de intervenção. Em comparação com a linha de base, a administração de D-GAL reduziu 11,6% do VO_{2pico} na 4ª semana ($p = 0,008$), e 12,2% após 8 semanas ($p = 0,003$; figura 7b). Além disso, o tempo total de exercício também foi reduzido nos ratos envelhecidos em ambos os momentos ($50,49 \pm 3,54$ vs. $44,24 \pm 2,31$ min; $p = 0,039$, e $50,49 \pm 3,54$ vs. $43,94 \pm 2,30$ min; $p = 0,024$; figura 7c), respectivamente. Um efeito da ANOVA mista foi encontrado no V_{pico} ($F_{2,54} = 3,453$; $p = 0,048$; figura 7d) e no trabalho total ($F_{2,54} = 4,542$; $p = 0,015$; figura 7e).

Quando comparados ao grupo CON, os ratos envelhecidos apresentaram os menores valores de VO_{2pico} ($53,58 \pm 1,81$ vs. $48,46 \pm 1,56$ ml.kg⁻¹.min⁻¹; $p = 0,044$; figura 7b), TTE ($52,62 \pm 2,57$ vs. $44,24 \pm 2,31$ min; $p = 0,023$; figura 7c) e, trabalho total ($327,61 \pm 23,86$ vs. $248,32 \pm 15,41$ Joules; $p = 0,011$; Figura 7e) após 4 semanas, e também trabalho total ($320,86 \pm 23,86$ vs. $268,32 \pm 15,24$ Joules; $p = 0,041$; figura 7e) após 8 semanas de administração de D-GAL. Além disso, o envelhecimento induzido pela D-GAL atenuou o trabalho total do exercício aeróbico. O grupo CON aumentou 26,8% ($p = 0,005$) do trabalho total em 4 semanas, e 24,2% ($p = 0,005$) após 8 semanas, no entanto, esta resposta não foi observada nos ratos envelhecidos (Figura 7e).

Figura 7 – Força muscular relativa, $VO_{2\text{pico}}$, Tempo total de exercício, V_{pico} e Trabalho total (J) durante a quarta semana e após 8 semanas de D-Galactose.

a) Força muscular relativa; b) $VO_{2\text{pico}}$; c) Tempo total de exercício (TTE); d) V_{pico} ; e) Trabalho total (J). Média $\pm$ EPM. Anova two way mista seguida de análise post hoc T de Student para V_{pico} , TTE e Trabalho (J) e análise post-hoc de Bonferroni para $VO_{2\text{pico}}$. *Diferença significativa vs CON ($p < 0,05$). # Diferença significativa vs. pré ($p < 0,05$). Grupos: CON ($n = 15$); D-GAL ($n = \leq 14$) e CON ($n = 8$); D-GAL ($n = 8$) para força muscular relativa.

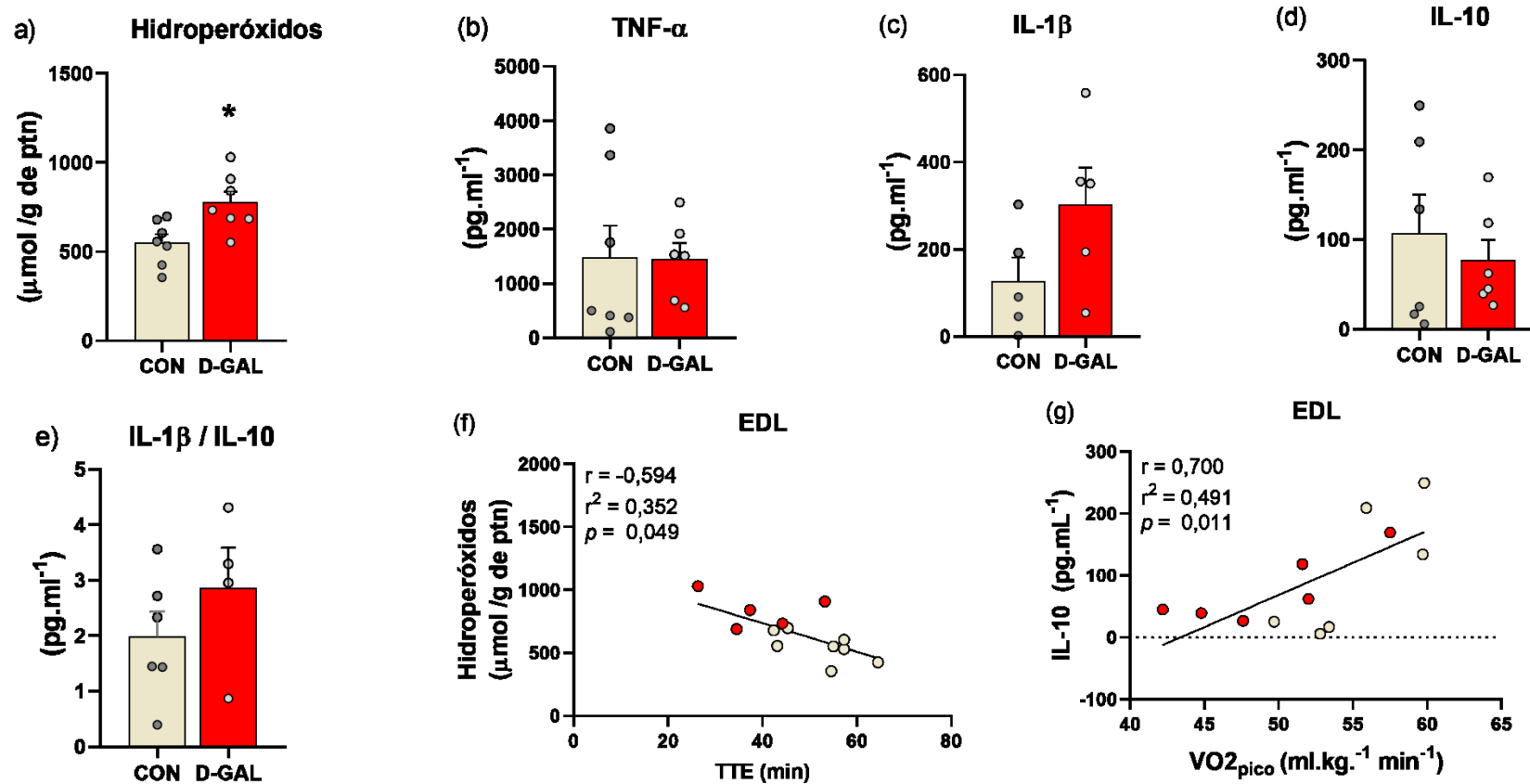


3.2.3 Análises no músculo esquelético

Os efeitos da intervenção nos parâmetros de estresse oxidativo foram observados no músculo esquelético. A administração de D-GAL aumentou significativamente ($t(12) = 2,949$; $p = 0,01$) os níveis de hidroperóxidos de lipídios no músculo EDL após 8 semanas de intervenção (Figura 8a). Foi observada uma correlação significativa e inversa ($r = -0,594$; $p = 0,049$; $r^2 = 0,352$; figura 8f) entre os níveis de hidroperóxidos e o tempo total de exercício, demonstrando a influência do estresse oxidativo no músculo esquelético no desempenho aeróbico. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas nas citocinas pró- ou anti-inflamatórias no músculo EDL (Figura 8b-e), também foi encontrada uma correlação significativa e positiva ($r = 0,700$; $p = 0,011$; $r^2 = 0,491$) entre os níveis de IL-10 e o $VO_{2\text{pico}}$ (Figura 8g), demonstrando o papel da citocina anti-inflamatória na preservação da capacidade aeróbica durante o envelhecimento.

Figura 8 - Níveis de hidroperóxidos de lipídios e citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-10 após 8 semanas de D-Galactose.

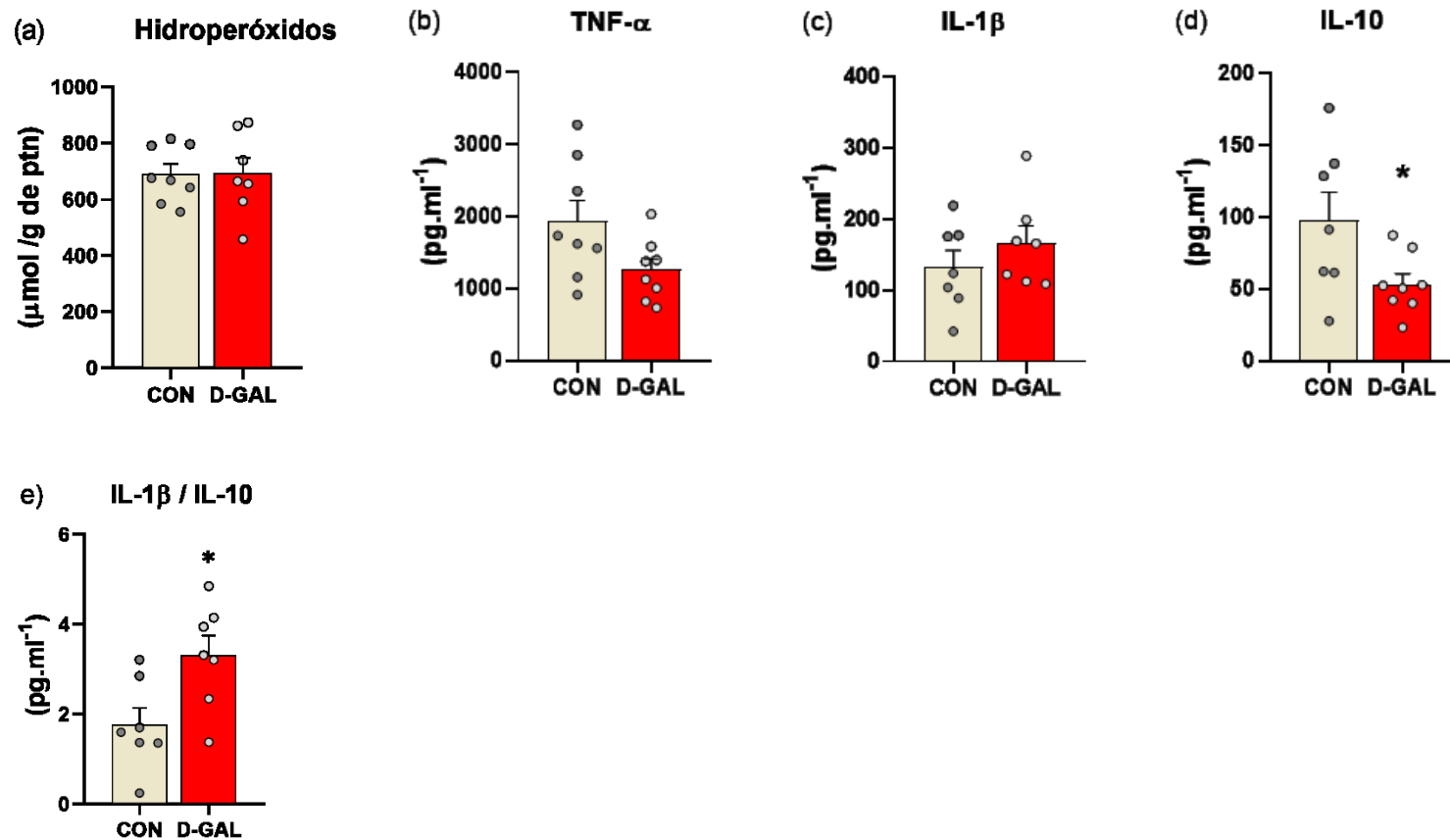
a) Hidroperóxidos – EDL; b) TNF- α – EDL; c) IL-1 β – EDL; d) IL-10; e) Razão IL-1 β / IL-10 – EDL. Média $\pm$ EPM. Análise: Teste T de Student. *Diferença significativa vs. CON ($p < 0,05$). Grupos: CON ($n = \leq 8$); D-GAL ($n = \leq 8$).



Fonte: Próprio autor

No músculo sóleo, D-GAL reduziu as concentrações de IL-10 ($t(13) = 2,232$; $p = 0,040$; figura 9d) e elevou a razão IL-1 β / IL-10 ($t(12) = 2,679$; $p = 0,010$; Figura 9e), demonstrando um *milieu* pró-inflamatório neste músculo. Entretanto, não foi observada correlação ($r = 0,239$; $p = 0,389$; $r^2 = 0,057$) entre IL-10 e VO₂pico (apêndice B). Não foram observadas diferenças significativas nas citocinas pró-inflamatórias (Figura 5b, c) e no estresse oxidativo (Figura 9a). Assim, não foi observada correlação ($r = 0,075$; $p = 0,788$; $r^2 = 0,005$) entre os níveis de hidroperóxidos de lipídios e o tempo total de exercício (Figura 9f) (Apêndice B).

Figura 9 – Níveis de hidroperóxidos de lipídios e de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória de TNF- α , IL-1 β e IL-10 após 8 semanas de D-Galactose. a) Hidroperóxidos – Sóleo; b) TNF- α – Sóleo; c) IL-1 β – Sóleo; d) IL-10 – Sóleo; e) Razão IL-1 β / IL-10 – Sóleo. Média $\pm$ EPM. Análise: Teste T de Student. *Diferença significativa vs. CON ($p < 0,05$). Grupos: CON ($n = \leq 8$); D-GAL ($n = \leq 8$).

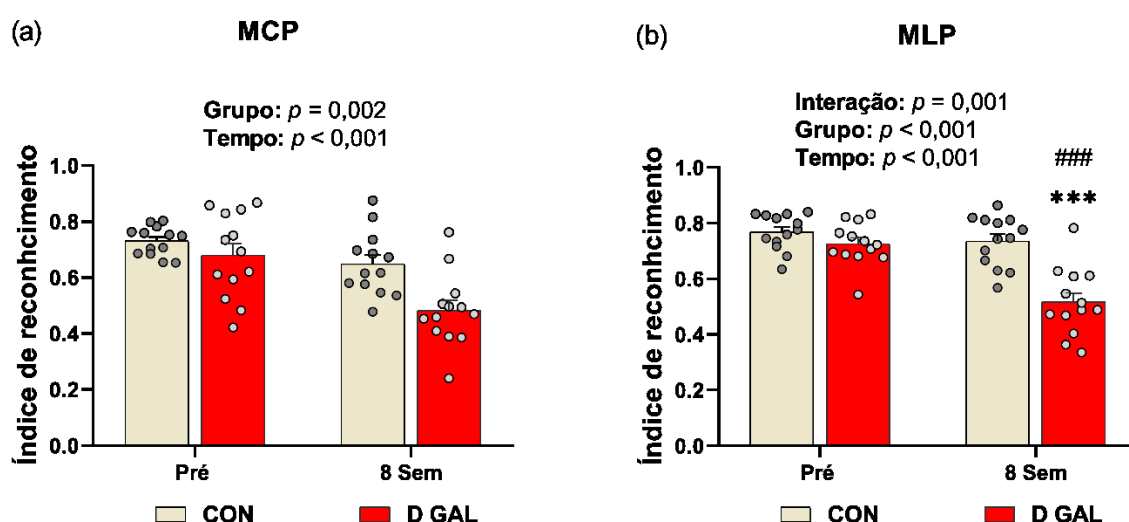


Fonte: Próprio autor

3.2.4 Memória de reconhecimento

A administração de D-GAL resultou em comprometimento na memória após 8 semanas de intervenção. Em comparação com a linha de base, os ratos envelhecidos reduziram o índice de reconhecimento na memória de longo prazo (MLP) ($p < 0,001$; figura 10b), demonstrando um declínio na memória de longo prazo. Além disso, em comparação com o grupo CON, os ratos envelhecidos apresentaram valores mais baixos ($p < 0,001$; figura 10b) no índice de reconhecimento na MLP após 8 semanas de intervenção. A ANOVA mista demonstrou um efeito significativo do tempo ($F_{1,24} = 18,554$; $p < 0,001$) e do grupo ($F_{1,27} = 11,077$; $p = 0,002$) no índice de reconhecimento da memória de curto prazo (MCP; figura 10a).

Figura 10 - Memória de curto e longo prazo antes e após 8 semanas de D-Galactose. a) MCP (Memória de curto prazo) – RON; b) MLP (Memória de longo prazo) - RON. Média $\pm$ EPM. Anova two way mista seguida de análise post-hoc de Bonferroni. *** Diferença significativa vs. CON – 8 semanas ($p < 0,001$), ### Diferença significativa vs.pré D-GAL ($p < 0,001$). Grupos: CON (n = 13); D-GAL (n = 13).



Fonte: Próprio autor

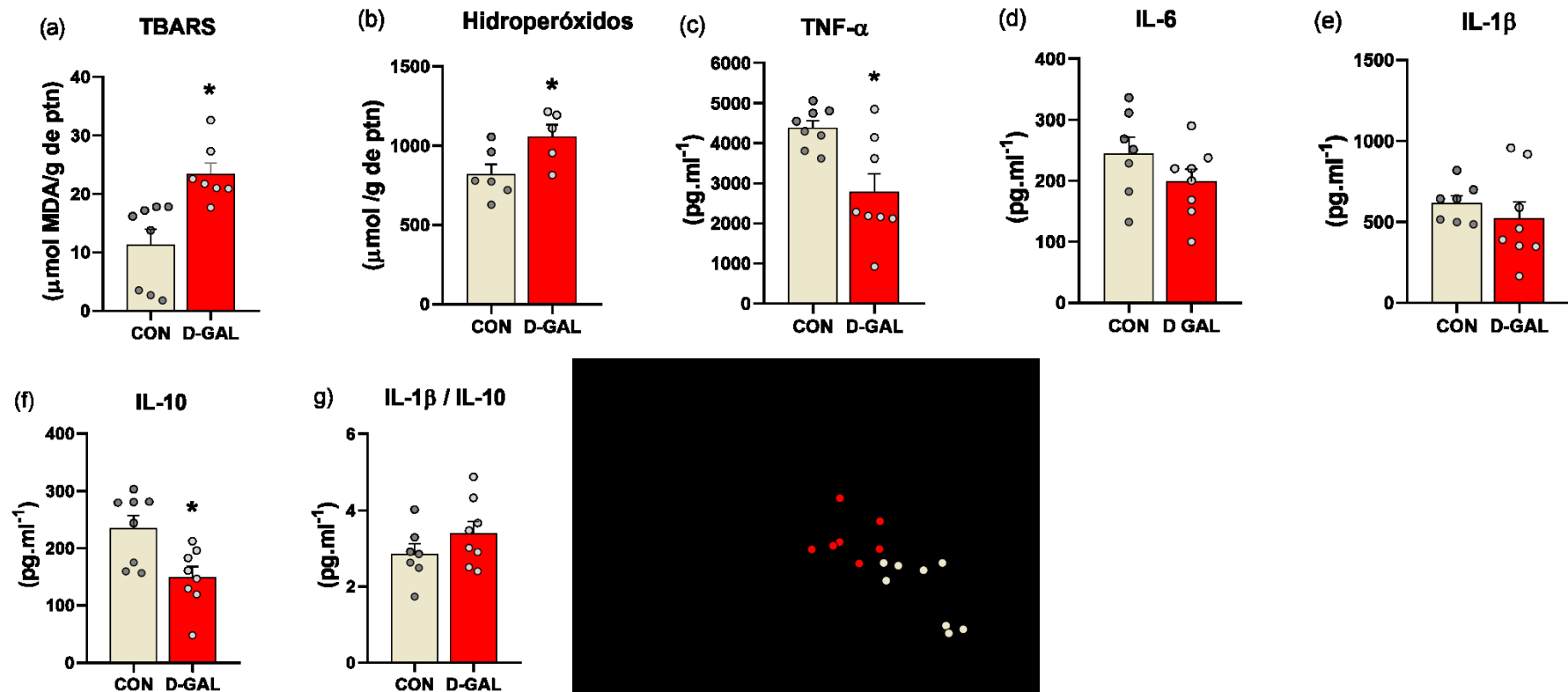
3.2.5 Análises no hipocampo

A D-Galactose (D-GAL) aumentou o estresse oxidativo no hipocampo e foi associado a uma diminuição da memória a longo prazo. Em comparação com o grupo CON, a administração de D-GAL aumentou os níveis de TBARS ($t(13) = 3,673$; $p = 0,020$; figura 11a) e de hidroperóxidos ($t(9) = 2,399$; $p = 0,040$; figura 11b) no hipocampo após 8 semanas de intervenção. Foi encontrada uma correlação significativa e inversa ($r = -0,773$; $p < 0,001$; $r^2 = 0,597$; figura 11h) entre os níveis de TBARS e o índice de reconhecimento de objetos na MLP, demonstrando a influência do estresse oxidativo na diminuição da memória. No entanto, não foi encontrada correlação significativa ($r = -0,477$; $p = 0,094$; $r^2 = 0,200$) entre os níveis de TBARS e o índice de discriminação de objetos na memória de curto prazo (MCP), e os níveis de hidroperóxidos na memória de curto ($r = -0,576$; $p = 0,063$; $r^2 = 0,332$) e de longo prazo ($r = -0,434$; $p = 0,181$; $r^2 = 0,188$) (Apêndice C).

Em comparação com o grupo CON, a administração de D-Galactose reduziu os níveis de TNF- α ($t(14) = 3,262$; $p < 0,011$; figura 11c) e IL-10 ($t(14) = 3,005$; $p < 0,001$; figura 11f) no hipocampo após 8 semanas de intervenção. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa nos níveis de IL-6 ($t(13) = 1,386$; $p = 0,189$; figura 11d), IL-1 β ($t(12) = 0,3766$; $p = 0,714$; figura 11e) e na razão IL1 β / IL-10 ($t(13) = 1,326$; $p = 0,1038$; Figura 11f). Além disso, não foi encontrada correlação entre os níveis de citocinas no hipocampo e o comprometimento da memória, incluindo IL-1 β e MCP ($r = -0,083$; $p = 0,786$; $r^2 = 0,007$) e IL-1 β e MLP ($r = -0,081$; $p = 0,773$; $r^2 = 0,006$) (Apêndice).

Figura 11- Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxidos de lipídios e citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-10 no hipocampo após 8 semanas de D-Galactose.

a) TBARS – Hipocampo; b) Hidroperóxidos – Hipocampo; c) TNF- α – Hipocampo; d) IL-6 – Hipocampo; e) IL-1 β – Hipocampo; f) IL-10 – Hipocampo; g) Razão IL-1 β / IL-10 – Hipocampo. Média $\pm$ EPM. Análise: Teste T de Student. * Diferença significativa vs. CON. TBARS ($p < 0,05$); CON. Hidroperóxidos ($p < 0,05$); CON. TNF- α ($p < 0,01$) e CON. IL-10 ($p < 0,001$). Grupos: CON ($n = \leq 8$); D-GAL ($n = \leq 8$).



Fonte: Próprio autor

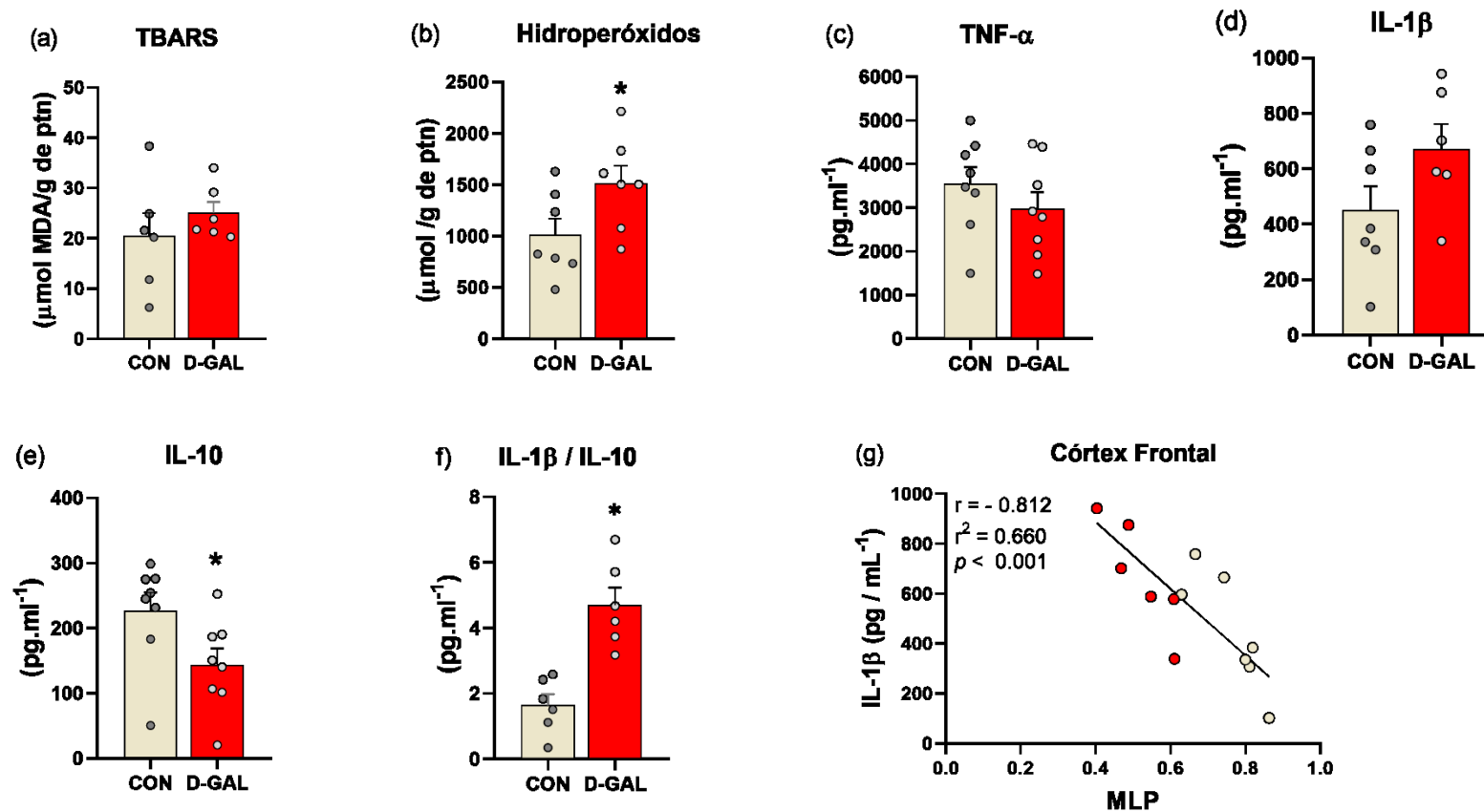
3.2.6 Análises no córtex frontal

Os resultados mostraram que em comparação com o grupo CON, a administração de D-GAL aumentou os níveis de hidroperóxidos ($t(12) = 2,179$; $p = 0,049$; figura 12b) no córtex pré-frontal após 8 semanas de intervenção. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa nos níveis de TBARS ($t(10) = 0,9037$; $p = 0,384$; figura 12a). Além disso, não foi encontrada qualquer correlação entre o estresse oxidativo no córtex frontal e a diminuição da memória para os níveis de TBARS e MCP ($r = -0,126$; $p = 0,695$; $r^2 = 0,016$), e MLP ($r = -0,459$; $p = 0,132$; $r^2 = 0,211$) e níveis de hidroperóxidos para MCP ($r = -0,386$; $p = 0,172$; $r^2 = 0,149$) e MLP ($r = -0,478$; $p = 0,083$; $r^2 = 0,228$) (apêndice D).

Ao analisar as citocinas pró - e anti-inflamatórias, os ratos envelhecidos apresentaram os menores valores ($t(14) = 2,224$; $p = 0,044$; figura 12e) na concentração de IL-10 em comparação com o grupo CON, após 8 semanas de intervenção. Nenhuma diferença significativa foi encontrada no TNF- α ($t(14) = 1,046$; $p = 0,314$; figura 12c) e IL-1 β ($t(11) = 1,754$; $p = 0,107$; figura 12d). Os ratos envelhecidos também apresentaram valores mais elevados na razão IL-1 β / IL-10 ($t(10) = 4,840$; $p < 0,001$; figura 12f) quando comparados ao grupo CON. Foi encontrada uma correlação significativa e inversa ($r = -0,812$; $p < 0,001$; $r^2 = 0,660$; Figura 12g) entre a concentração de IL-1 β no córtex frontal e o índice de reconhecimento da MLP, demonstrando o papel da citocina pró-inflamatória no comprometimento da memória. Por outro lado, não foi encontrada correlação significativa entre os níveis de IL-1 β no córtex frontal e o índice de reconhecimento da memória de curto prazo (MCP) ($r = -0,028$; $p = 0,925$; $r^2 < 0,001$) (apêndice D).

Figura 12 – Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), hidroperóxidos de lipídios e citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória de TNF- α , IL-1 β e IL-10 no córtex frontal após 8 semanas de administração de D-Galactose.

a) TBARS - Córtex frontal; b) Hidroperóxidos – Córtex frontal; c) TNF- α – Córtex frontal; d) IL-1 β – Córtex frontal; e) IL-10 – Córtex frontal e f) Razão IL-1 β / IL-10 – Córtex frontal. Média $\pm$ EPM. Teste T de Student. *Diferença significativa vs. CON. Hidroperóxidos ($p < 0,05$) e CON. IL-10 ($p < 0,05$). Grupos: CON ($n = \leq 8$); D-GAL ($n = \leq 8$).



Fonte: Próprio autor

3.3 DISCUSSÃO

A administração de D-Galactose (D-GAL) diminuiu a capacidade aeróbica e a memória de longo prazo e foi associado ao aumento do estresse oxidativo no músculo EDL, bem como no hipocampo e córtex frontal. Além disso, verificou-se aumento no *millieu* pró-inflamatório no músculo sóleo, no hipocampo e córtex frontal. Embora o envelhecimento esteja associado a redução da força e massa muscular, no presente estudo não foram encontradas alterações significativas na massa corporal, massa muscular e na força muscular relativa nos ratos D-GAL.

A massa corporal não foi diferente entre os grupos (CON e D-GAL) após oito semanas de intervenção, corroborando com estudos anteriores que utilizaram a injeção de D GAL na mesma dosagem de e pelo mesmo período utilizados neste trabalho (Duan *et al.*, 2017). Tampouco houve diferença no índice de adiposidade e na massa dos músculos sóleo e EDL entre os grupos. Esses achados sugerem que a maturação dos animais ao longo do tempo não foi afetada pela D-GAL (Cardoso *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2020). No que diz respeito à massa muscular, não avaliamos danos à arquitetura muscular, diâmetro das fibras musculares e síntese e degradação de proteínas, parâmetros que nos permitiriam uma análise mais precisa de possíveis alterações nos músculos esqueléticos, não observadas em nosso experimento.

Pesquisas anteriores mostraram que a administração de D-GAL em diferentes dosagens podem causar diminuição da massa muscular e prejuízo na síntese e degradação de proteínas no músculo pela inibição da via de sinalização autofágica AMPK – FOXO3a e aumento de ubiquitina e Atrogin1/MAFBx (Fan *et al.*, 2017; Kou *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2023).

A força muscular avaliada pelo teste de força máxima em escada vertical aumentou igualmente ao longo do tempo nos dois grupos (D-GAL e CON), indicando que a administração de 150 mg⁻¹.kg⁻¹.dia⁻¹ de D-galactose não interferiu na força muscular nesses animais. Contrário aos nossos resultados, Chang *et al.*, (2014) e Wu *et al.*, (2022) encontraram em camundongos idosos, diminuição da força muscular, avaliada através do teste de força de preensão das patas (GRIP), comumente utilizado para indicar alteração neuromuscular. Segundo os autores, a

diminuição da força, observada nos camundongos que receberam D-GAL (125 e 100 $\text{mg}^{-1}.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ via subcutânea e i.p. por 8 e 6 semanas, respectivamente), estaria associada às alterações morfológicas e disfunção na atividade do complexo I encontradas nas mitocôndrias do músculo esquelético e na homeostase proteica destes animais. Essas modificações morfológicas estariam associadas a um quadro exacerbado de apoptose no músculo (Chang *et al.*, 2014), principalmente em função do elevado estresse oxidativo. A alteração na homeostase proteica pode inibir a via de sinalização de IGF-1 / AKT / MTOR / p70s6k que estariam contribuindo para a perda de massa muscular e consequente perda de força nestes animais (Wu *et al.*, 2022). Em nosso estudo utilizamos para a avaliação da força muscular o teste de carga máxima em escada vertical, proposto anteriormente (Gomes *et al.*, 2014; Magalhães *et al.*, 2022). É possível que este teste não tenha sido sensível o bastante para avaliar alterações na força muscular. Além disso, não podemos excluir que fatores como diferenças de linhagens animais, dosagens, tempo e vias de administração de D-GAL podem ter resultado em achados diferentes (Yanar *et al.*, 2019).

Por outro lado, o principal achado desse estudo foi a diminuição da capacidade aeróbica em ratos D-GAL, incluindo VO_2pico , tempo total de exercício e capacidade de realizar trabalho. Alguns poucos estudos verificaram a capacidade de realizar exercício físico, seja pela avaliação da atividade locomotora em testes comportamentais de campo aberto e labirinto aquático de Morris (Partadiredja *et al.*, 2018; Xingua *et al.*, 2023), incluindo a dose de 150 $\text{mg}^{-1}.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de D-GAL i.p. por 6 semanas (Zhang *et al.*, 2023) ou pela corrida voluntária em roda (Belviranli M, Okudan N, 2019; Lee *et al.*, 2019), sem no entanto avaliar a capacidade oxidativa máxima dos animais. Portanto, de forma inédita, o presente estudo demonstrou que o protocolo de envelhecimento via administração de D-GAL reduziu a capacidade aeróbia máxima.

Já está bem estabelecido, que o envelhecimento em humanos pode diminuir o $\text{VO}_2\text{máx}$ (Shepard *et al.*, 2009), a diferença arteriovenosa, reduzir o débito cardíaco, a biogênese mitocondrial, diminuir o fluxo sanguíneo muscular e aumentar a resistência periférica, levando à disfunção endotelial e a uma menor capacidade oxidativa muscular, prejudicando assim a realização de tarefas cotidianas (Schrage *et al.*, 2007; Betik; Hepple, 2008; Chodzko-Zajko *et al.*, 2009; Garatachea *et al.*, 2015; Pandey *et al.*, 2020). O consumo máximo de oxigênio está intimamente

relacionado ao prognóstico de doenças cardiovasculares relacionadas a idade (Ross *et al.*, 2016). Em trabalho anterior, a injeção i.p. de $150 \text{ mg}^{-1}.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de D GAL por 8 semanas em ratos Wistar similar ao nosso estudo, causou elevação na apoptose nos cardiomiócitos, evidenciada pela ativação das caspases -3 e -9 (proteínas pró-apoptóticas) e diminuição da expressão das proteínas anti-apoptóticas (BCL-xL, Bcl-2), em comparação ao grupo controle (Chen *et al.*, 2018). Embora não tenhamos avaliado estas proteínas e vias de sinalização, é tentador especular que, em nosso estudo, a diminuição na capacidade aeróbia dos animais do grupo D GAL, possa ter sido modulada por um ou mais destes mecanismos.

Associado a diminuição do desempenho físico aeróbico, estudos em animais tem mostrado que o aumento do estresse oxidativo avaliado por hidroperóxidos de lipídios no musculo esquelético podem contribuir para os efeitos deletérios do envelhecimento (Yanar *et al.*, 2019). No presente estudo, os ratos envelhecidos por D-GAL apresentaram aumento significativo na concentração de hidroperóxidos de lipídios no musculo EDL na qual este aumento foi inversamente correlacionado com o tempo total de exercício até a fadiga. Uma das respostas esperadas no modelo de envelhecimento por D-GAL é o aumento do estresse oxidativo em tecidos centrais (Cui *et al.*, 2006; Budni *et al.*, 2016) e periféricos, incluindo o músculo esquelético (Azman Zakaria *et al.*, 2019). Os danos aos lipídios insaturados das membranas celulares são mediados pela ação oxidante das espécies reativas de oxigênio (EROS) resultando em peroxidação lipídica e formação de hidroperóxidos lipídicos, os principais produtos primários da peroxidação lipídica, e que promovem dano peroxidativo devido a geração de radicais livres (LO e LOO) induzindo citotoxicidade, morte celular, inflamação, e modificações na estrutura de diversas células (Ayala *et al.*, 2014). Achados anteriores demonstraram que a D-GAL, administrada na dosagem de $60 \text{ mg}^{-1}.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ i.p. por 6 semanas em ratos, induziu o aumento da concentração de hidroperóxidos lipídicos no músculo esquelético, causando disfunção mitocondrial, aumento de conteúdo de proteínas carbonila (um marcador de dano oxidativo) e um comprometimento na homeostase redox muscular (Yanar *et al.*, 2019). A disfunção mitocondrial ocasionada pelo envelhecimento no musculo esquelético, especificamente no EDL, um musculo que possui predominantemente fibras do tipo II, tem sido relacionada com o aumento de espécies reativas de oxigênio e apoptose celular (Gomes *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2022), e com a diminuição do desempenho

físico aeróbico ocasionada pelo declínio da atividade da enzima citocromo oxidase do complexo IV (Betik; Hepple, 2008) e da força muscular causado pela disfunção na atividade do complexo I (Chang *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2022).

No presente estudo os resultados demonstraram que as concentrações de IL-10 no músculo sóleo foram reduzidas nos ratos D-GAL evidenciando uma diminuição na capacidade anti-inflamatória neste tecido. Neste sentido, a redução de IL-10 no músculo esquelético em decorrência do processo de envelhecimento, pode estar associada a uma maior ativação de macrófagos, liberação de antígenos e citocinas inflamatórias (Hacham *et al.*, 2004; Moore *et al.*, 2001; Mittal; Roche., 2015 Dagdeviren *et al.*, 2017). No presente estudo, demonstramos que a IL-10 foi correlacionada com o desempenho aeróbico avaliado pelo VO₂pico. Corroborando com nossos resultados, maiores concentrações de IL-10 no soro sanguíneo têm sido correlacionadas diretamente com uma melhor aptidão aeróbica (VO₂máx) em idosos (Rosado-Perez; Mendoza-Nunez, 2018). Além disso, quando analisamos a razão pró-inflamatória entre IL-1 β / IL-10 no músculo sóleo verificamos um *milieu* inflamatório neste tecido. O estado pró-inflamatório crônico e de baixo grau, encontrado no envelhecimento, pode ser explicado pela maior ativação da via de sinalização do fator de transcrição (NF-K β) que regula a produção de citocinas pró-inflamatórias, que são ativadas pela produção aumentada de estresse oxidativo, autofagia prejudicada, danos ao DNA e aumento de células senescentes em diversos tecidos do organismo (Bektas *et al.*, 2017; Francheschi *et al.*, 2018).

O envelhecimento tem sido descrito como um fator de risco para o desenvolvimento da neuroinflamação cerebral e de doenças neurodegenerativas (Li *et al.*, 2023). As células neuronais e gliais envelhecidas contribuem para o declínio funcional da memória (Ron Harrel; Schwartz, 2009; Li *et al.*, 2023). Processos inflamatórios em resposta ao envelhecimento podem ocorrer pela disfunção da homeostase e defesa imunológica de astrócitos e micróglia que levam ao aumento do estresse oxidativo e na liberação de citocinas pró-inflamatórias no SNC e consequentemente a morte neuronal (Li *et al.*, 2023).

No que concerne à memória, os resultados do presente estudo demonstraram que a memória foi afetada negativamente pela D-GAL. Esses resultados corroboram com dados na literatura que mostram prejuízo na funcionalidade da memória avaliado pelo Teste de Reconhecimento de Objetos em ratos e camundongos que receberam a dose de 150 mg⁻¹.kg⁻¹.dia⁻¹ de D-GAL com

duração de oito semanas (Duan *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2021), 6 semanas (Sun *et al.*, 2018) e 10 semanas (Nan *et al.*, 2019). Como encontrado em nosso estudo, a redução da capacidade cognitiva foi acompanhada do aumento de estresse oxidativo no hipocampo e no córtex frontal associada a uma correlação inversa entre maiores níveis de TBARS e diminuição da MLP.

O hipocampo e o córtex frontal são estruturas associadas a formação da memória e descritas como regiões vulneráveis ao estresse oxidativo devido a sua alta demanda metabólica de oxigênio e glicose (Garcez *et al.*, 2021). Nossos resultados mostraram que no hipocampo a produção de TBARS e hidroperóxidos de lipídios foi aumentada nos ratos envelhecidos por D-GAL. Esses dados corroboram com a literatura, que encontraram maiores concentrações de TBARS e MDA hipocampal em ratos na dose de $100 \text{ mg}^{-1}.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de D-GAL por 8 (Garcez *et al.*, 2021) e 6 semanas (Budni *et al.*, 2016) e na dose de $150 \text{ mg}^{-1}.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ por 8 semanas (Banji *et al.*, 2014). Esse aumento do estresse oxidativo pode ser explicado pela ação deletéria de D-GAL que pode promover aumento de EROS e consequentemente causar danos oxidativos no cérebro (Ullah *et al.*, 2015; Yaribeygi *et al.*, 2018).

Quando avaliamos o córtex frontal nossos resultados também demonstraram que as concentrações de hidroperóxidos de lipídios foram aumentados no córtex pré-frontal no grupo D-GAL, indicando o aumento do estresse oxidativo.

Acompanhado do estresse oxidativo, vários estudos de revisão e de pesquisa básica sustentam que a administração sistêmica crônica de D-Gal intraperitoneal ou subcutânea podem induzir a inflamação no SNC (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2017; Azman; Zakaria 2019; Lin *et al.*, 2020; Kumari *et al.*, 2022). Os mecanismos pelos quais a D-GAL promove neuroinflamação está relacionada a quantidades excessivas desse açúcar no organismo que são catalisadas pela enzima galactose oxidase em aldose e peróxido de hidrogênio que geram EROS pelo metabolismo oxidativo e glicosilação que ativam NF-KB e sua ação transcricional em citocinas inflamatórias (Kumari *et al.*, 2022). No presente estudo, nossos resultados mostraram que as concentrações de IL-10 no hipocampo e córtex frontal foram reduzidas, evidenciando uma atenuação na capacidade anti-inflamatória após a intervenção com D-GAL.

Os resultados encontrados de IL-10 no hipocampo e córtex frontal corroboram com estudos anteriores em roedores que mostraram diminuição da

concentração dessa citocina em ratos Sprague-Dawley e camundongos Swiss albino utilizando a dosagem de 150 e 100 mg⁻¹.kg⁻¹.dia⁻¹ por 8 e 6 semanas de D GAL, respectivamente (Zhang *et al.*, 2021; Kumari *et al.*, 2022).

Entretanto, no presente estudo, os níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo e córtex frontal não foram alteradas quando comparados os ratos envelhecidos ao grupo controle. Esses dados diferem da literatura, que apontam para o aumento na concentração dessas citocinas no cérebro e no plasma sanguíneo de animais envelhecidos por D-Gal (Zhang *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2021). Por outro lado, quando analisamos a razão pró-inflamatória de IL-1 β / IL-10 no córtex frontal, a inflamação foi aumentada no grupo D-GAL, indicando um *milieu* inflamatório (Kumari *et al.*, 2022). Além disso, foi encontrada uma correlação inversa entre maiores concentrações de IL-1 β e diminuição no reconhecimento de objetos na memória de longo prazo (MLP). Os estudos anteriores mostraram que concentrações elevadas de IL-1 β no cérebro de animais idosos induzido por lipopolissacarídeo (LPS), um importante ativador da resposta imunológica apresentaram efeitos prejudiciais na memória de longo prazo em resposta a neuroinflamação devido a hiperatividade da micróglia associada a maior indução de IL-1 β (Henry *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2008; Huang; Sheng *et al.*, 2010).

Inesperadamente, a concentração da citocina TNF- α no hipocampo apresentou diminuição significativa no grupo D-GAL quando comparado ao grupo controle indicando uma atenuação desta citocina nessa região, entretanto sem apresentar alteração no córtex frontal. Como demonstrado em estudos anteriores, a D-GAL pode induzir elevação de TNF- α no hipocampo (Kumari *et al.*, 2022). O TNF- α se liga aos seus receptores que estimulam a transcrição e a produção da enzima IK β quinase, a fosforilação do complexo proteico I κ B pela κ B quinase inibitória (IKK) ativa NF- κ B promovendo a transcrição de TNF- α (Batista MI, Jr. *et al.*, 2009; Dhingra *et al.*, 2009). Apesar do prejuízo na memória estar envolvida com processos inflamatórios, no presente estudo a redução no comprometimento da memória pode estar mais associada ao aumento nos parâmetros de estresse oxidativo induzido pela D-GAL do que pela inflamação.

No presente estudo demonstramos uma correlação inversa entre o aumento de TBARS no hipocampo e memória de longo prazo. Estudos de revisão demonstraram que o envelhecimento por administração de D-GAL com diferentes dosagens, tempo de administração e linhagens associado ao aumento de estresse

oxidativo podem promover diminuição da memória (Sadigh-Eteghad *et al.*, 2017; Azman; Zakaria, 2019). O estresse oxidativo é considerado o principal fator causador das doenças neurodegenerativas (Rehman *et al.*, 2016). O desequilíbrio redox celular causado pelo envelhecimento no metabolismo oxidativo promove o aumento de EROS que culmina na oxidação de lipídios, proteínas, danos ao DNA e aumento do estresse oxidativo, prejudicando a função celular, promovendo morte neuronal e comprometimento da memória (Hermann *et al.*, 2014; Rehman *et al.*, 2017; Budni *et al.*, 2016).

Nesse estudo encontramos que o aumento do estresse oxidativo pode ser uma via que poderia explicar a perda de memória com o envelhecimento.

3.4 CONCLUSÃO DO ESTUDO 1

No presente estudo, o desempenho aeróbico avaliado pelo $\text{VO}_{2\text{pico}}$ e a memória de longo prazo foram reduzidos significativamente no modelo de envelhecimento por D-Galactose, e se mostraram associados a danos oxidativos no músculo EDL, bem como no hipocampo e córtex frontal. Além disso, verificou-se que a administração de D-Gal provocou inflamação no músculo sóleo, no hipocampo e no córtex frontal de ratos.

4 EXPERIMENTO 2 – TREINAMENTO FÍSICO E SUPLEMENTAÇÃO DE FLAVONÓIS DE CACAU: IMPACTOS NO DESEMPENHO FÍSICO, MEMÓRIA E RESPOSTAS NEUROTROFICAS, IMUNOQUÍMICAS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM UM MODELO EXPERIMENTAL DE ENVELHECIMENTO POR D-GALACTOSE

4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 Animais e cuidados éticos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFMG, protocolo nº 161/2020 – anexo A) e conduzido conforme as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e pelo Guia dos National Institutes of Health (Publicações NIH Nº 8023, revisado em 1978). Utilizamos nesse estudo 45 ratos Wistar machos, com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e foi fornecido água e ração padrão livremente durante todo o período experimental. O ambiente foi controlado em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com temperatura mantida em $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

4.1.2 Delineamento experimental

A partir da chegada ao biotério local, os ratos foram habituados ao ambiente laboratorial por sete dias e pareados inicialmente pela massa corporal. Em seguida, realizaram a familiarização em escada vertical e corrida em esteira rolante por três e cinco dias consecutivos, respectivamente. Vinte e quatro horas após a familiarização à escada e esteira, os animais foram submetidos ao teste de força máxima (TFM) e ao teste incremental de corrida para avaliação do desempenho físico de força e aeróbio.

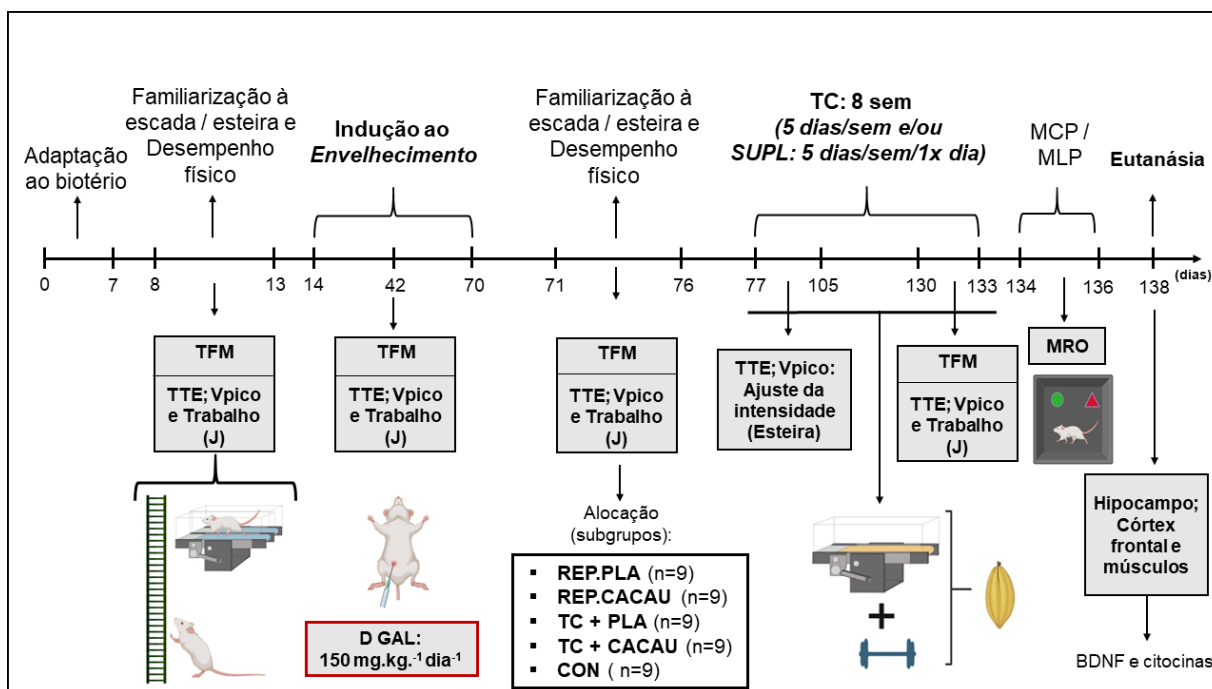
O processo de indução ao envelhecimento foi iniciado após os testes com a administração de D-galactose em todos os animais por 8 semanas. Durante a quarta semana de envelhecimento (28 dias), foram avaliados o desempenho físico de força e aeróbico. Após o protocolo de senescência induzida, os ratos foram submetidos novamente ao teste de força e incremental (Apêndice E) e foram

equilibrados de acordo com a carga máxima e maior velocidade pico obtidos nos testes de desempenho físico em quatro grupos experimentais ($n= 9$ / grupo). Os grupos foram submetidos à gavagem oral de solução placebo (PLA) contendo cafeína e teobromina ou flavonoides do cacau (CACAU) e permaneceram em repouso (REP) ou realizaram treinamento combinado (TC), constituído por oito séries de escalada em escada vertical com cargas progressivas variando entre 50 a 100% do TFM e esteira em intensidade a 60% da velocidade pico por 30 minutos. Um grupo controle (CON) foi submetido apenas ao protocolo de envelhecimento e permaneceu assim por todo o período experimental, e utilizado para ser comparado ao grupo PLA repouso. Comparações estatísticas entre PLA vs. CON: (APÊNDICES F-M).

A suplementação de flavonoides do cacau e/ou placebo foi realizada uma vez ao dia, cinco dias por semana, durante oito semanas (Melo *et al.*, 2022). Para o ajuste da intensidade de esforço, o teste de carga máxima foi realizado no início de cada semana de treinamento, iniciando o teste com a carga máxima obtida na semana anterior para a prescrição da carga a ser utilizada na respectiva semana. Para o ajuste do treinamento aeróbico, o teste incremental foi repetido ao final da quarta semana de treinamento para ajuste da intensidade e durante a última semana de TC para avaliar os possíveis efeitos da suplementação crônica de flavonóis e/ou do treinamento sobre o desempenho físico.

Após vinte e quatro horas da finalização da sessão experimental, os ratos foram submetidos ao teste de Memória de Reconhecimento de Objetos (MRO) para avaliação da memória, com duração de três dias. Vinte e quatro horas após a última sessão de teste, os ratos foram eutanasiados por decapitação em guilhotina, sem sedação prévia. Amostras de sangue foram processadas e os tecidos (hipocampo, córtex pré-frontal e músculo sóleo) foram coletados e armazenados para análises posteriores. Todos os procedimentos foram realizados entre 08:00 e 17:00 horas. A figura 13 apresenta o delineamento experimental do estudo.

Figura 13 - Delineamento experimental do estudo 2. Teste de força máxima; TTE: Tempo total de exercício; Vpico: Velocidade pico; Trabalho (J): Trabalho em joule; D GAL: D – Galactose; TC: Treinamento físico combinado (Força + aeróbico); Supl: Suplementação com placebo ou cacau; MRO: Teste de reconhecimento de objetos novos; MCP: Memória de curto prazo; MLP: Memória de longo prazo; BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro; REP.PLA: Grupo repouso placebo; REP.CACAU: Grupo repouso cacau; TC + PLA: Treinamento físico associado a suplementação de placebo; TC + CACAU: Treinamento físico associado a suplementação de cacau.



Fonte: Próprio autor

4.1.3 Indução ao envelhecimento

As alterações tipo envelhecimento foram induzidas por meio da administração de 150 mg/kg/dia de D-galactose (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA, G0750), diluída em solução salina a 0,9%, (100 mg.mL⁻¹), aplicada via injeção intraperitoneal durante 8 semanas (Lin *et al.*, 2020).

4.1.4 Memória de reconhecimento

As memórias de curto e longo prazo foram avaliadas por meio do teste de reconhecimento de objetos (MRO). No primeiro dia, os ratos foram colocados no centro de uma caixa de madeira (70 cm x 70 cm - comprimento x 40 cm - altura) por 5 minutos sem a presença de objetos para a familiarização ao ambiente. No

segundo dia, durante a fase de treinamento, dois objetos iguais (A) (Garrafa de vidro) foram colocados paralelamente nas extremidades da caixa (7,5 cm de distância das paredes) para livre exploração por 10 minutos. Sessenta minutos após o treinamento, a avaliação da memória de curto prazo (MCP) foi realizada por 5 minutos, com um novo objeto (B) (Lego) substituindo um objeto familiar (A). No terceiro dia, a memória de longo prazo (MLP) foi avaliada por 5 minutos, utilizando um novo objeto (C) (Garrafa plástica) no lugar do objeto (B). No segundo e terceiro dia do teste, os animais foram posicionados inicialmente na extremidade oposta à dos objetos com a cabeça voltada para a parede. A cada avaliação, a arena e os objetos foram limpos com álcool 70% para evitar pistas olfativas (Bevins; Besheer, 2006; Crunfli et al., 2019) (Figura 4 – Estudo 1).

O software Any Maze foi utilizado para a análise dos resultados (ANY maze Vídeo Tracking System 7.16; STOELTING CO. ©, 2022). Foi calculado o índice de reconhecimento de objetos, que consiste no tempo gasto pelo rato para explorar o novo objeto dividido pela soma da exploração do objeto novo e do objeto familiar (Bevins; Besheer, 2006; Rojas *et al.*, 2013).

4.1.5 Desempenho de força muscular

Os ratos foram familiarizados a escada vertical (1,1 m × 0,18 m, 2 cm de grade, inclinação 80°) por três dias consecutivos. Inicialmente os ratos foram mantidos por 60 segundos na câmara de alojamento, e em seguida colocados na escada a 35 cm, 55 cm e 110 cm de distância até o topo. A cada tentativa os animais permaneceram na câmara de alojamento por 60 segundos (Figura. 5a – Estudo 1).

O teste de força máxima consistiu na subida inicial do animal com uma carga correspondente a 75% da massa corporal na 1ª semana de avaliação da força máxima, fixada na parte proximal da cauda, em tubos Falcon de 50 mL com pesos de pescaria acoplados a cabo de aço revestido de plástico fixados por uma fita de borracha (Scotch 3 M) (Conforme descrito no estudo 1 – tópico 3.1.4). Para as avaliações seguintes (Durante a 4ª semana de protocolo de envelhecimento a 8ª semana de treinamento combinado e/ ou suplementação de placebo ou flavonóis do cacau) foi utilizado a carga máxima encontrada no teste de força máxima realizado anteriormente (Magalhães *et al.*, 2022). A análise dos resultados foi realizada

utilizando a carga máxima relativa utilizando a seguinte equação: $\text{Carga relativa} = (cm/mc)$, onde CM é a carga máxima obtida no teste de força e MC , a massa corporal do animal em quilogramas (Figura. 5b – Estudo 1).

4.1.6 Capacidade aeróbica máxima e desempenho aeróbico

O protocolo de familiarização a corrida em esteira rolante (Panlab/Havard Apparatus, Cornella Spain) foi realizado durante cinco dias consecutivos por 5 minutos diários a uma velocidade incremental ajustada a cada minuto (10, 10, 11, 13 e 15 m.min⁻¹) com inclinação em 5% e estímulo elétrico fixado em 0,28 mA (Prímola-Gomes *et al.*, 2009).

O teste em esteira (Panlab/Harvard Apparatus, Cornella, Barcelona, Spain) foi iniciado na velocidade de 10 m.min⁻¹, com incrementos progressivos em 1 m. min⁻¹ a cada 3 minutos. O teste foi interrompido quando o animal não conseguiu mais acompanhar a velocidade da esteira, escolhendo permanecer na grade de estimulação elétrica por 10 segundos ininterruptos. A inclinação foi fixada em 5% e a estimulação elétrica em 0,28 mA. O desempenho aeróbico foi avaliado pelo tempo total de exercício (TTE) e velocidade pico (V_{pico}) obtida durante o último estágio do teste incremental. A V_{pico} foi calculada utilizando a seguinte equação: $V_{pico} = v + (t/180)$, onde v é a velocidade em (m.min⁻¹) do último estágio completo; t = tempo em segundos do último estágio incompleto. O trabalho total foi calculado utilizando a seguinte equação: Trabalho (Joules) = $mc \times g \times v \times \sin \theta \times t$, onde MC é a massa corporal do animal em quilogramas; g : A aceleração da gravidade (9,8 m.s⁻²); v : A velocidade da esteira em metros por minuto; $\sin \theta$: O ângulo de inclinação da esteira (5°) e t : O tempo gasto em cada estágio em minutos (Soares *et al.*, 2019).

4.1.7 Protocolo de treinamento combinado

O modelo de treinamento combinado compreendeu a realização de exercício aeróbico em esteira a 60% da V_{pico} , com duração de 30 minutos, e exercício de força em escada vertical, consistindo em oito séries em intensidades progressivas de 50 a 100% do TFM (Melo *et al.*, 2022; Magalhães *et al.*, 2022). O treinamento combinado foi realizado em dias alternados, seguindo um padrão

específico de programação. Uma semana foi planejada com três dias de subida em escada (treinamento de força) e dois dias de corrida em esteira (treinamento aeróbico). Na semana seguinte, a programação consistiu em três dias de exercício aeróbico e dois dias de treinamento de força (adaptado de Özbeyli *et al.*, 2017).

4.1.8 Suplementação de flavonóis do cacau e solução placebo

A suplementação dos flavonóis do cacau foi realizada por meio do extrato em pó de cacau enriquecido com 30% de flavonóis (composição (g.100g⁻¹): 1,39g (+)- catequinas; 6,10g (-)- epicatequinas, 0,89g cafeína; 5,01g teobromina, NATUREX® Powder, Avignon, França) dissolvido em água (18 mg.ml⁻¹). A solução placebo foi equilibrada com a suplementação dos flavonóis do cacau em cafeína e teobromina (composição (g.100g⁻¹): 0,89g cafeína; 5,01g teobromina, SIGMA-ALDRICH®, Missouri, EUA). Ambas as soluções (flavonóis do cacau e placebo) foram administradas via gavagem oral, 60 minutos antes da realização da sessão de treinamento físico combinado, utilizando a dose equivalente à 45 mg.kg⁻¹ de massa corporal (Melo *et al.*, 2022) durante 08 semanas. O tempo escolhido entre a suplementação e o início da seção de treinamento físico foi definido previamente, de tal forma que a sessão de exercício se iniciasse quando a o pico da concentração de catequinas e epicatequinas no plasma dos ratos tivesse sido alcançado (Melo *et al.*, 2022).

4.1.9 Eutanásia, índice de adiposidade e massa muscular

Os ratos foram submetidos à eutanásia por meio de decapitação em guilhotina, sem sedação prévia, 24 horas após a última sessão do teste de memória. Os tecidos hipocampo, córtex frontal e músculo sóleo foram removidos e congelados em nitrogênio e em seguida armazenados a -80 °C para análises posteriores. Os tecidos adiposos retroperitoneal (TAR), mesentérico (TAM) e epididimal (TAE) foram retirados completamente e pesados em uma balança (SHIMADZU® Modelo BL320H, precisão de 0,001g) para a determinação do índice de adiposidade (IA), utilizando a seguinte equação: Índice de adiposidade = (TAR + TAM + TAE) / MC x 100. Para verificar a massa muscular foi utilizado a seguinte equação: (Massa muscular / Massa corporal total).

4.1.10 Citocinas pró e anti-inflamatórias

As concentrações de interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 1 β (IL-1 β) e do fator de necrose tumoral (TNF- α) foram avaliadas no hipocampo, córtex pré-frontal e sóleo por meio de ELISA (Melo *et al.*, 2022) (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA; DuoSet kits DY506, DY522, DY501, e DY510, respectivamente). Todas as análises foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante.

4.1.11 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

As concentrações de BDNF no hipocampo e córtex frontal foram analisadas por meio do método ELISA (ELISA; Human/Mouse BDNF DuoSet kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Para as análises teciduais, foi realizado um protocolo de homogeneização no qual 80 mg de tecido foram homogeneizados com 0,8 mL de solução de extração de citocinas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C, e o infranadante foi retirado e congelado a -80°C para posterior análise por ELISA, seguindo todas as recomendações do fabricante.

4.1.12 Análise estatística

A normalidade e a homocedasticidade dos resíduos foram avaliadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média. A comparação dos efeitos do treinamento aeróbico e da suplementação crônica dos flavonóis do cacau sobre os parâmetros de composição corporal, desempenho aeróbico e de força muscular (TTE, Vpico, produção de trabalho e carga máxima), parâmetros inflamatórios e BDNF foi realizada por meio da ANOVA two-way considerando suplementação (PLA ou CACAU) e atividade (REP ou TC). Quando encontradas diferenças significantes foi realizado o teste post hoc T de Student para as variáveis: de desempenho físico e memória e para as variáveis de citocinas e BDNF considerando a média do coeficiente de variação (>15%) dos quatro grupos (PLA, CACAU, TC e TC + CACAU) (Sampaio, 2007). Todas as análises foram realizadas no software R.

(versão 4.2.2, USA) com interface RStudio (versão 2023.06 + 421) O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

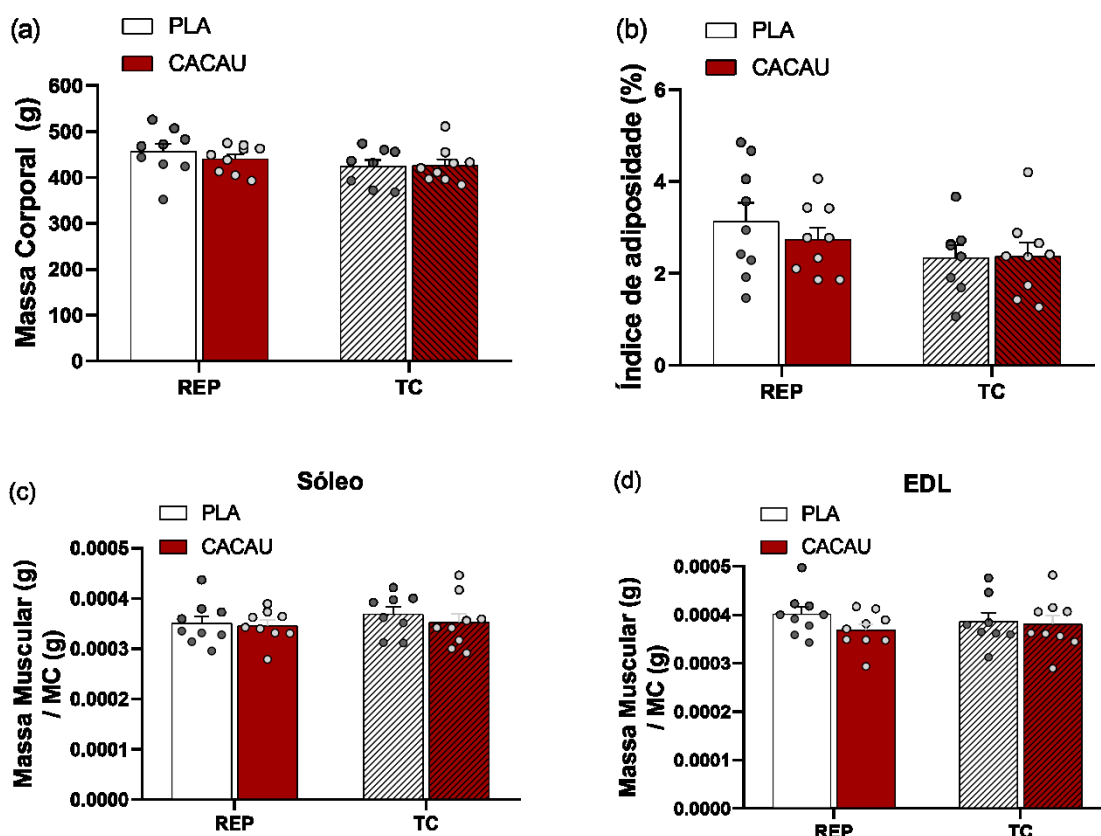
4.2 RESULTADOS

4.2.1 *Composição corporal, índice de adiposidade e massa muscular*

A massa corporal total e o índice de adiposidade não foram significativamente alterados pelo treinamento combinado ($F= 2,80$; $p= 0,10$ e $F= 3,37$; $p= 0,07$, respectivamente) e/ou pela suplementação de flavonóis do cacau ($F= 0,20$; $p = 0,65$ e $F= 0,32$; $p= 0,57$, respectivamente) em comparação com o grupo repouso placebo. Não foi observada interação significativa entre os fatores ($F= 0,40$; $p = 0,52$; $F= 0,45$; $p = 0,50$, respectivamente) (Figura 14a-b).

Não houve efeito do treinamento sobre a massa dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) ($F= 1,31$ $p = 0,394$; $F= 1,31$; $p = 0,928$, respectivamente) A suplementação de flavonóis do cacau, associada ou não ao treinamento físico combinado, também não alterou a massa dos tecidos ($F= 1,31$ $p = 0,472$ e $F= 1,31$; $p = 0,239$, respectivamente). em comparação com o grupo de repouso placebo. Não foi observado efeito significativo de interação entre os fatores no músculo sóleo ($F = 1,31$; $p = 0,680$) e EDL ($F= 1,31$; $p = 0,389$) (Figura 14c-d).

Figura 14 - Massa corporal total (a), índice de adiposidade (b), massa muscular relativo à massa corporal total do músculo sóleo (c) e EDL (d) após oito semanas de treinamento físico e/ou suplementação de flavonóis do cacau. Dados estão expresso em média $\pm$ EPM. Análise: ANOVA two way; PLA = placebo; CACAU = flavonóis do cacau; REP = repouso; TC = treinamento físico combinado. Grupos: REP.PLA (n=9) e CACAU (n=9) e TC.PLA (n=8) e CACAU (n=9).



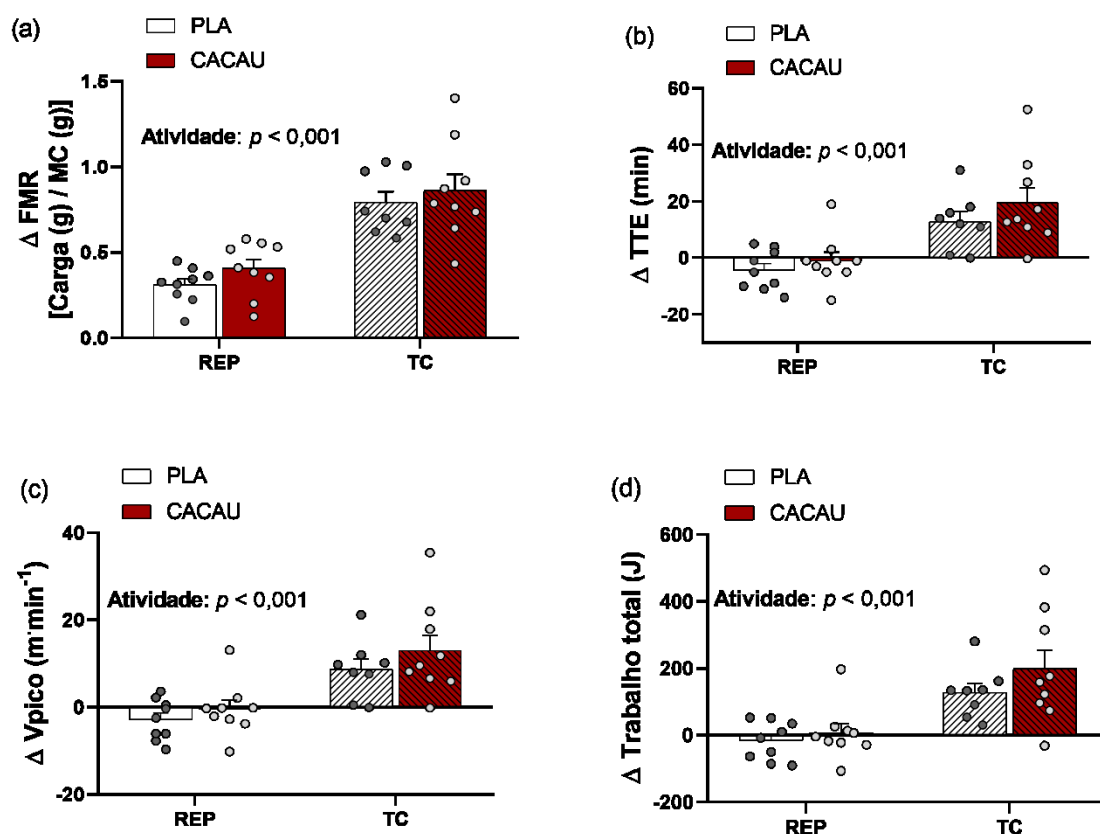
Fonte: Próprio autor

4.2.2 Desempenho físico

Os animais submetidos ao treinamento físico, apresentaram aumento no desempenho aeróbico e na força máxima. Conforme esperado, observamos um efeito de treinamento com aumento na força relativa à massa corporal ($F = 50,09$; $p < 0,01$), no tempo total de exercício (TTE) ($F = 26,17$; $p < 0,01$), Vpico ($F = 24,90$; $p < 0,01$) e no trabalho total realizado ($F = 22,32$; $p < 0,01$). Não foram identificados efeitos da suplementação de flavonóis e nem interações significativas entre os fatores na força relativa ($F = 0,04$; $p = 0,83$), TTE ($F = 0,19$; $p = 0,65$), Vpico ($F = 0,14$; $p = 0,70$) e trabalho ($F = 0,44$; $p = 0,50$) (Figura 15a-d).

Os ratos que realizaram treinamento físico apresentaram aumento no desempenho de força e aeróbico, incluindo, força muscular, TTE, Vpico e trabalho total, quando comparados aos ratos repouso independente da suplementação com flavonóis do cacau (Figura 15a-d).

Figura 15 - Delta (Δ) da força relativa pela massa corporal (a), do tempo total de exercício (b), da velocidade pico (c) e do trabalho realizado (d) após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico. Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: ANOVA two way. PLA = placebo; CACAU = flavonóis do cacau; REP = repouso; TC = treinamento físico combinado. Grupos: TC.PLA (n=8) e CACAU (n=9) vs. REP.PLA (n=9) e CACAU (n=9).



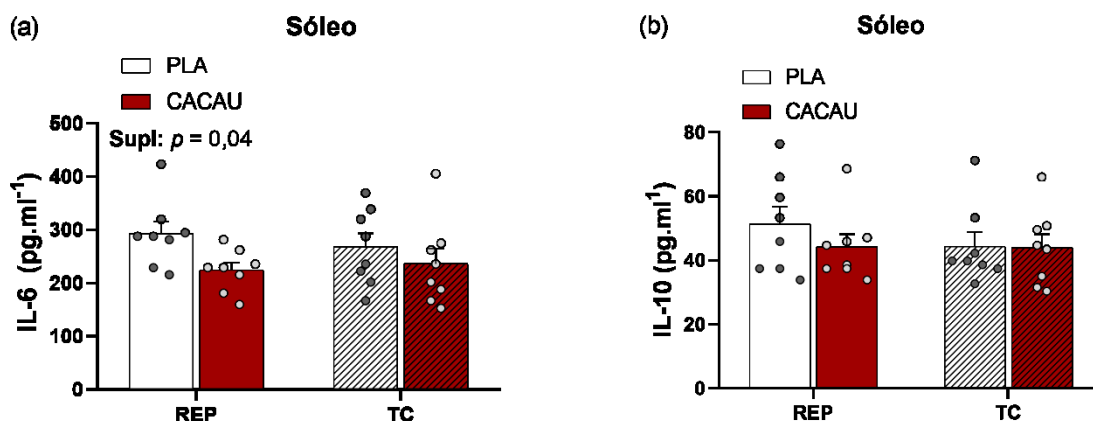
Fonte: Próprio autor

4.2.3 Análises no músculo sóleo

A suplementação com flavonóis do cacau *per si* foi capaz de atenuar o aumento da concentração da citocina pró-inflamatória IL-6 no músculo sóleo em comparação com o grupo de repouso placebo, mostrando um efeito significativo da

suplementação ($F = 4,61$; $p = 0,04$). O treinamento físico, por outro lado, não foi capaz de atenuar a inflamação no músculo sóleo ($F = 0,07$; $p = 0,78$). A interação entre os principais fatores não foi observada ($F = 0,61$, $p = 0,43$). Ao analisarmos a citocina anti-inflamatória IL-10, não foi identificada interação significativa entre os fatores ($F = 0,53$; $p = 0,46$), ou efeito isolado da suplementação de flavonóis do cacau ou do treinamento físico ($F = 0,69$; $p = 0,41$ e $F = 0,62$; $p = 0,43$, respectivamente) (Figura 16a-b).

Figura 16 - Citocinas de ação pró (a) e anti-inflamatória (b) no músculo sóleo após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico. Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: ANOVA two way. PLA = placebo; CACAU = flavonóis do cacau; REP = repouso; TC = treinamento físico combinado. Grupos: REP.PLA ($n=8$) e CACAU ($n=8$) e TC.PLA ($n=8$) e CACAU ($n=8$).



Fonte: Próprio autor

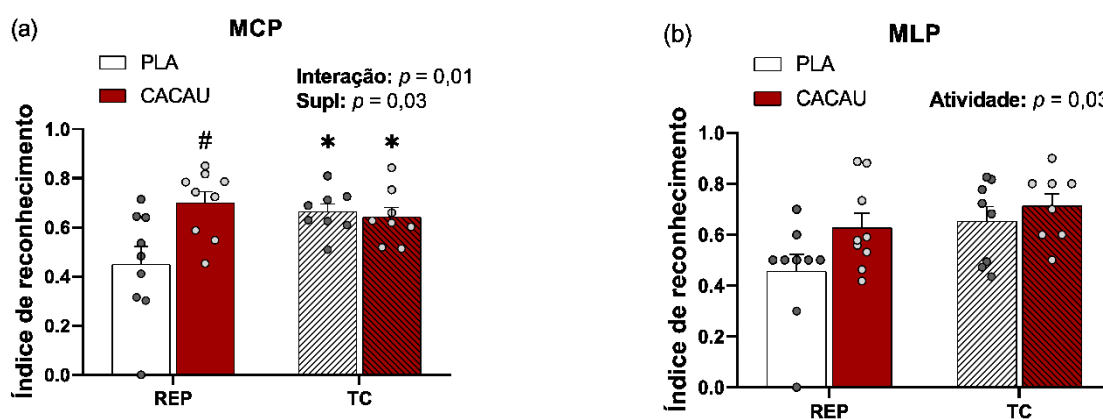
4.2.4 Memória de reconhecimento

A suplementação de flavonóis do cacau se mostrou eficaz na melhoria da memória de curto prazo em comparação ao grupo repouso placebo ($p = 0,01$), evidenciando um efeito significativo da suplementação ($F = 4,78$; $p = 0,03$). Tanto o treinamento físico (TC) quanto o TC associado à suplementação de flavonóis do cacau, apresentaram melhorias na memória em comparação ao grupo repouso placebo ($p = 0,02$ e $p = 0,04$, respectivamente). Vale ressaltar que, para a memória de curto prazo, observou-se interação entre os fatores - suplementação de flavonóis

do cacau e treinamento físico ($F = 6,78$; $p = 0,01$), mas sem apresentar efeito do treinamento combinado *per si* ($F = 2,25$; $p = 0,14$) (Figura 17a).

No que diz respeito à memória de longo prazo, os ratos treinados que receberam a suplementação de flavonóis do cacau, apresentaram atenuação da disfunção cognitiva (queda na memória) em comparação ao grupo repouso placebo, demonstrando um efeito significativo do treinamento ($F = 5,00$; $p = 0,03$). Além disso, não foram observados efeitos significativos da suplementação, nem interação entre os principais fatores ($F = 3,18$; $p = 0,08$ e $F = 0,68$; $p = 0,41$, respectivamente) (Figura 17b). Na fase de treino do reconhecimento de objetos novos (RON) com dois objetos idênticos, não foram identificadas diferenças no tempo de exploração entre os objetos utilizados ($p < 0,05$) (Apêndice A).

Figura 4 - Índice de reconhecimento de objetos da memória de curto prazo (a), da memória de longo prazo (b) após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico. Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. PLA = placebo; COCOA = flavonóis do cacau; REP = repouso; TC = treinamento físico combinado. Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos. Análise post hoc para efeito de suplementação: # $p = 0,01$ para REP.CACAU vs. REP.PLA; * $p = 0,02$ para TC.PLA vs. REP.PLA; * $p = 0,04$ para TC. CACAU ($n=9$) vs. REP.PLA. Grupos: REP.PLA ($n=8$) e CACAU ($n=8$) e TC.PLA ($n=8$) e CACAU ($n=8$).



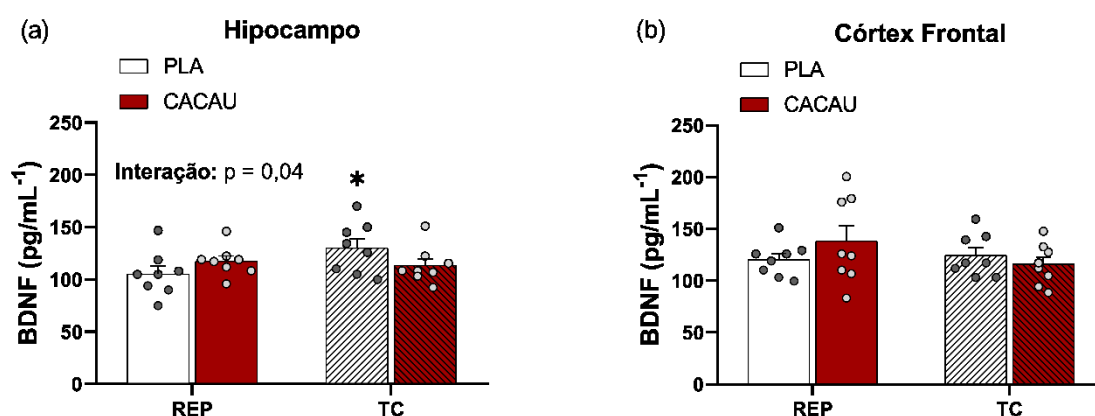
Fonte: Próprio autor

4.2.5 Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)

O treinamento físico, *per si*, elevou os níveis de BDNF no hipocampo em comparação ao grupo repouso placebo ($p = 0,04$), porém, não demonstrou efeitos aditivos quando combinado com a suplementação de flavonóis do cacau. Os resultados revelaram uma interação significativa entre os principais fatores ($F = 4,21$; $p = 0,04$); no entanto, não foram observados efeitos significativos da suplementação com flavonóis ou do treinamento isoladamente ($F = 0,09$; $p = 0,76$ e $F = 2,21$; $p = 0,14$, respectivamente) (Figura 18a).

Os níveis de BDNF no córtex frontal não apresentaram diferenças significantes na interação entre os fatores ($F = 1,99$; $p = 0,16$), na suplementação de flavonóis do cacau ou no treinamento ($F = 0,23$; $p = 0,63$ e $F = 0,97$; $p = 0,33$, respectivamente) (Figura 18b).

Figura 18 - Nível de fator neurotrófico derivado do cérebro no hipocampo (a), e no córtex frontal (b) após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico. Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: ANOVA two way. PLA = placebo; CACAU = flavonóis do cacau; REP = repouso; TC = treinamento físico combinado. Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos. Análise post hoc para efeito de interação: $*p = 0,04$ para REP.PLA vs. TC.PLA. Grupos: REP.PLA ($n=8$) e CACAU ($n=8$) e TC.PLA ($n=8$) e CACAU ($n=8$).



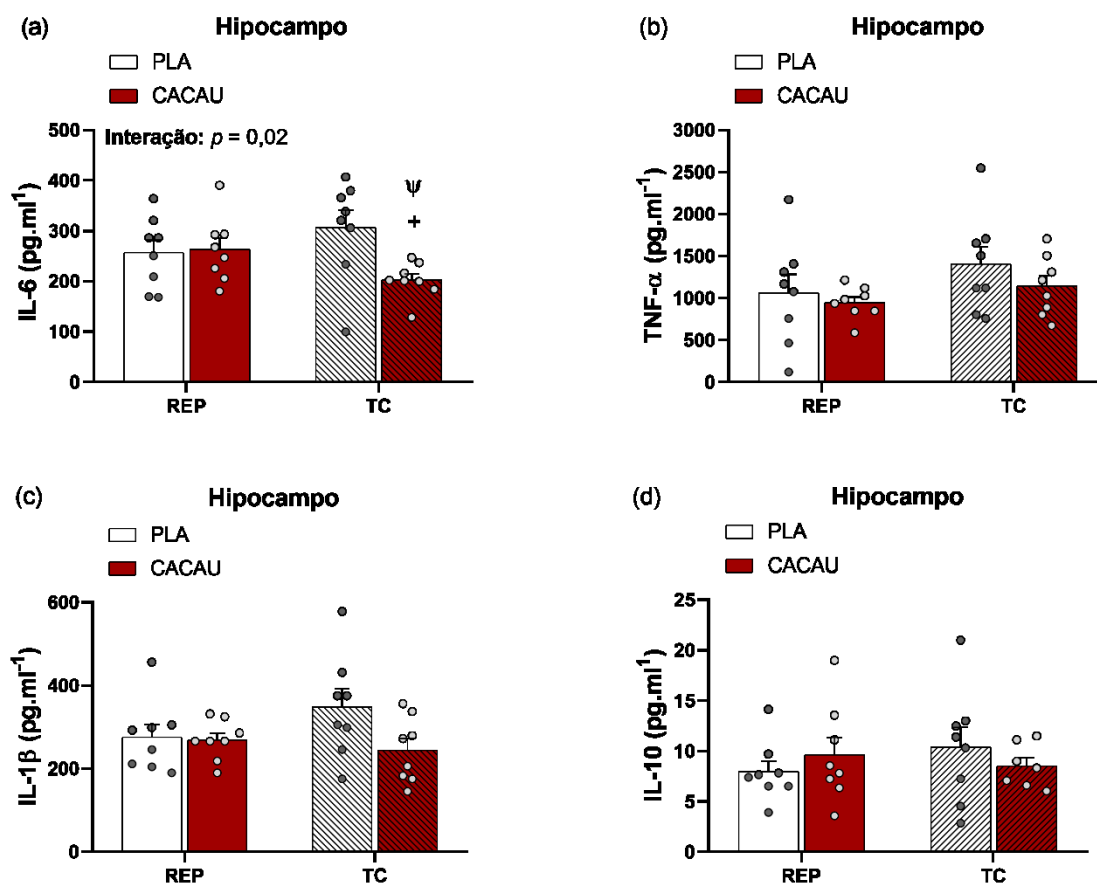
Fonte: Próprio autor

4.2.6 Análises no hipocampo

O perfil imunoquímico do hipocampo foi modificado pelo treinamento físico associado à suplementação de flavonóis do cacau, resultando em uma redução nos níveis de IL-6 em comparação com o grupo repouso cacau ($p = 0,03$) e com o grupo de treinamento físico isolado ($p = 0,01$). Não foram observados efeitos significativos do treinamento ($F = 0,37$; $p = 0,54$) ou da suplementação com flavonóis isoladamente ($F = 1,99$; $p = 0,16$). No entanto, foi evidenciado um efeito de interação entre os principais fatores – suplementação de flavonóis do cacau e treinamento físico ($F = 4,79$; $p = 0,03$). No hipocampo não foram encontradas diferenças nos resultados da concentração da citocina anti-inflamatória IL-10 entre os grupos. Importante notar que não houve interação entre os fatores ($F = 1,36$; $p = 0,25$), efeito da suplementação de flavonóis do cacau ($F = 0,01$; $p = 0,96$) ou do treinamento ($F = 0,17$; $p = 0,67$) (Figura 19a-b).

Quando analisamos os resultados das citocinas pró-inflamatórias IL1 β e TNF- α no hipocampo, não foi identificada interação entre os principais fatores – suplementação de flavonóis do cacau e treinamento físico ($F = 2,42$; $p = 0,13$ e $F = 0,18$; $p = 0,66$, respectivamente), efeito de suplementação ($F = 3,17$; $p = 0,08$ e $F = 1,24$; $p = 0,27$, respectivamente) ou efeito de treinamento no hipocampo ($F = 0,61$; $p = 0,44$ e $F = 2,56$; $p = 0,12$, respectivamente) (Figura 19c-d).

Figura 5 - Citocinas de ação pró-inflamatória e anti-inflamatória no tecido hipocampo (a-d) após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico. Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: ANOVA two way. PLA = placebo; CACAU = flavonóis do cacau; REP = repouso; TC = treinamento físico combinado. Apenas os efeitos principais da ANOVA que foram significativos são exibidos nos gráficos. Análise post hoc para efeito de interação: $\psi p = 0,03$ para TC. CACAU vs. REP.CACAU. e $^+p = 0,01$ para TC. CACAU vs. TC.PLA e Grupos: REP.PLA (n=8) e CACAU (n=8) e TC.PLA (n=8) e CACAU (n=8).



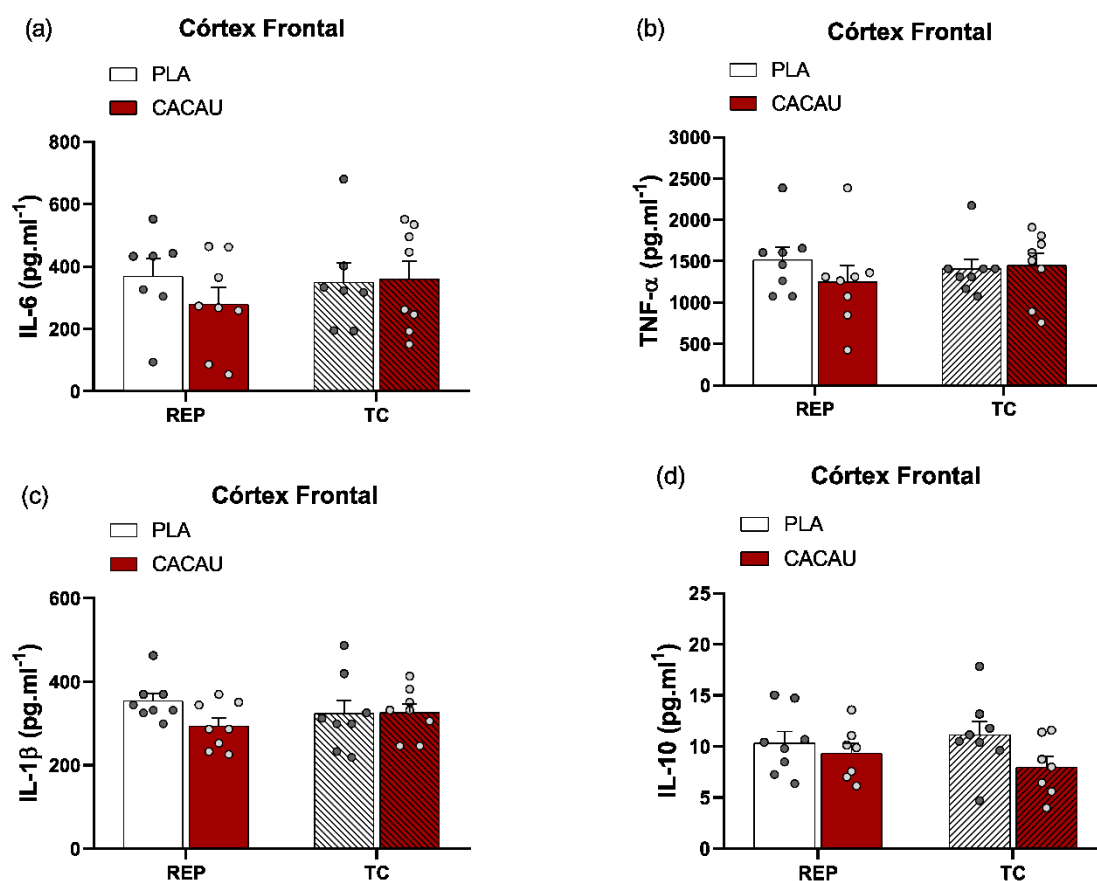
Fonte: Próprio autor

4.2.7 Análises no córtex frontal

No córtex frontal, não foram observadas diferenças significativas na interação entre os principais fatores, para IL-6 ($F = 0,56$; $p = 0,45$) e IL-10 ($F = 0,90$; $p = 0,35$). Também não houve efeito de suplementação ($F = 0,33$; $p = 0,56$), IL-10 ($F = 1,36$; $p = 0,25$) ou de treinamento ($F = 0,35$; $p = 0,55$ e $F = 0,06$; $p = 0,80$, respectivamente). As citocinas pró-inflamatórias IL1 β e TNF- α também não apresentaram alterações entre os grupos repouso e treinamento físico, e não foi

observada interação entre os principais fatores ($F = 1,81$; $p = 0,18$ e $F = 0,99$; $p = 0,32$, respectivamente), suplementação ($F = 1,62$; $p = 0,21$ e $F = 0,52$; $p = 0,47$, respectivamente) ou treinamento ($F = 0,01$; $p = 0,95$ e $F = 0,09$; $p = 0,76$, respectivamente) (Figura 20a-d).

Figura 20 - Citocinas de ação pró-inflamatória e anti-inflamatória no tecido córtex frontal (a-d) após oito semanas de intervenção com suplementação de flavonóis do cacau e/ou treinamento físico. Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: ANOVA two way. PLA = placebo; CACAU = flavonóis do cacau; REP = repouso; TC = treinamento físico combinado. Grupos: REP.PLA (n=8) e CACAU (n=8) e TC.PLA (n=8) e CACAU (n=8).



Fonte: Próprio autor

4.3 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo, foi que o treinamento físico (TC), associado à suplementação de flavonóis do cacau por oito semanas, melhorou a

memória de curto prazo e diminuiu a inflamação no hipocampo de ratos induzidos ao envelhecimento por D-GAL. Além disso, a suplementação de cacau *per si* melhorou a memória de curto prazo e atenuou a inflamação no músculo sóleo. Ademais, o TC por si só aumentou a concentração de BDNF no hipocampo e melhorou o desempenho físico de força e aeróbico nesses animais. Entretanto, não houve alterações na massa corporal, no índice de adiposidade e na massa dos músculos sóleo e EDL nos animais estudados. Cabe salientar o ineditismo deste trabalho em demonstrar os efeitos benéficos do TC associado à suplementação de flavonóis do cacau sobre a memória, a inflamação hipocampal e muscular em ratos experimentalmente senescentes, utilizando a administração de D-galactose.

Estudos têm demonstrado que o TC ou a suplementação de flavonóis do cacau podem atenuar o ganho de massa corporal (Ozbeylli *et al.*, 2017; Melo *et al.*, 2022; Yoo E Kim *et al.*, 2021) e o índice de adiposidade em ratos resistentes a insulina (Melo *et al.*, 2022). No entanto, nossos resultados não mostraram diminuição da massa corporal, do índice de adiposidade e nem alterações na massa dos músculos sóleo e EDL entre os grupos REP e TC, independentemente da suplementação, após oito semanas de intervenção. Tem sido relatado que a administração de $150 \text{ mg}^{-1}.\text{kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ de D-GAL por 6 semanas causa atrofia no músculo gastrocnêmio de ratos Sprague Dawley, pela ativação da via de degradação proteica de ubiquitina e Atrogin-1/MAFbx, e inibição da ativação da via de sinalização anabólica AMPK/SIRT1/PGC1 α (Kou *et al.*, 2017). No entanto, como limitação do nosso estudo, não avaliamos a área de secção transversa e o diâmetro das fibras musculares dos músculos sóleo e EDL, que podem ter sido modificados em resposta ao TC e/ou à suplementação de flavonóis do cacau. Além disso, não investigamos as vias de sinalização celular, participantes da síntese e degradação de proteínas, e que podem ser alteradas no processo de envelhecimento (Kou *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2017; Lavin *et al.*, 2019).

O envelhecimento pode causar uma série de alterações morfológicas e funcionais, tais como a redução da capacidade aeróbica e de força muscular, com consequente diminuição da força e potência muscular (Garatachea *et al.*, 2015). Dentre outras alterações fisiológicas associadas ao envelhecimento estão, a diminuição do VO₂máx, do débito cardíaco máximo, da diferença arteriovenosa, da atividade e quantidade de enzimas antioxidantes, da biogênese mitocondrial e do metabolismo oxidativo (Chodzko-Zajko *et al.*, 2009; Garatachea *et al.*, 2015). Neste

sentido, o treinamento físico aeróbico e de força tem sido proposto para melhorar a capacidade aeróbica e de força muscular e mitigar os efeitos do envelhecimento (Fragala *et al.*, 2019; Izquierdo *et al.*, 2021). Ainda, os flavonóis do cacau podem promover maior expressão de PGC1 α e atividade da enzima citrato sintase concorrendo para o aumento da biogênese mitocondrial e para a melhora da capacidade aeróbica (Watanabe *et al.*, 2014; Aprotosoaie *et al.*, 2016).

Em nosso estudo, o TC promoveu melhora no desempenho físico aeróbico e de força quando comparado aos grupos repouso PLA e CACAU, demonstrando a eficácia do protocolo de treinamento adotado. Como esperado, o TC, no qual a intensidade do treinamento aeróbico e de força, correspondeu a 60% da v_{pico} e a 50 a 100% do TFM, respectivamente, foi eficaz em aumentar a capacidade aeróbica e a força muscular nos animais treinados. Entretanto não houve efeitos aditivos quando comparadas as duas intervenções. O grupo CACAU *per se* não apresentou melhora nos parâmetros de capacidade aeróbica e de força muscular, em comparação ao grupo PLA REP. Em um trabalho de nosso laboratório, Melo *et al.*, (2022) mostraram que ratos Wistar sedentários e resistentes à insulina, que foram suplementados com 45 mg⁻¹.kg⁻¹.dia⁻¹ de flavonóis do cacau, tiveram atenuação na redução do tempo total de exercício e da v_{pico} em comparação ao grupo repouso placebo, após oito semanas de intervenção.

Verificamos que a força muscular não foi diminuída pela administração de D-GAL nos grupos repouso PLA e CACAU. A massa corporal e a dos músculos sóleo e EDL desses animais não diminuíram ao longo do tempo de intervenção, indicando um processo normal de maturação, o que pode ter influenciado para que houvesse o aumento da força ao longo do período experimental. Tikhonova *et al.*, (2014) mostrou que 150 mg⁻¹. Kg⁻¹. dia⁻¹ de D-galactose por 57 dias não alteraram a massa corporal de ratos Wistar de 12 semanas de idade em comparação ao grupo controle. Por outro lado, Chang *et al.*, (2014) mostrou que camundongos C57BL/6J administrados com mg⁻¹. Kg⁻¹. dia⁻¹ de D-GAL por 8 semanas tiveram prejuízo na força neuromuscular quando avaliados pelo teste Grip. Em nosso estudo, utilizamos o teste de carga máxima em escada vertical para a avaliação da capacidade de força muscular (Gomes *et al.*, 2014; Magalhaes *et al.*, 2022). Esses resultados nos permitem sugerir que a utilização de outros tipos de testes para avaliação da força máxima pode ser mais sensível para a detecção de alterações na força muscular, e

que linhagens diferentes de roedores podem trazer resultados diferentes sobre a força muscular em animais experimentalmente envelhecidos por D-GAL.

Em relação à diminuição de desempenho físico aeróbico, estudos têm mostrado que o treinamento físico e/ou a suplementação de flavonóis do cacau podem reduzir a inflamação muscular e auxiliar na recuperação muscular em atletas (Corr *et al.*, 2021), no entanto, estudos em idosos são escassos.

Neste sentido, investigamos os efeitos do TC e/ou da suplementação de flavonóis do cacau sobre a citocinas pró (IL-6) e anti-inflamatória (IL-10) no músculo esquelético. Verificamos que a suplementação com flavonóis do cacau foi eficaz em atenuar a inflamação muscular, analisada via concentração de citocinas pró- (IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) no músculo sóleo, quando comparada ao grupo repouso PLA., Já Melo *et al.*, (2021), em nosso laboratório, mostraram que ratos Wistar resistentes à insulina não apresentaram diminuição de IL-6 no músculo gastrocnêmio após a suplementação com flavonóis do cacau na dosagem de $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ por 8 semanas. Outro estudo, em humanos saudáveis, mostrou que a ingestão crônica de flavonóis do cacau (> 2 meses) reduziu o estresse oxidativo induzido pelo exercício físico, sem diminuir a inflamação (Massaro *et al.*, 2019).

A ação dos flavonóis do cacau no músculo esquelético inflamado, pode ocorrer pela inibição de fatores transcricionais envolvidos na síntese de citocinas inflamatórias, incluindo NF-KB e o complexo enzimático IKB quinase, que inibem a atividade das principais enzimas inflamatórias (Ellinger; Stehle, 2016).

Em resposta ao TC esperávamos a diminuição de IL-6 e a elevação de IL-10 nos animais treinados. Já foi verificado que, a longo prazo, o treinamento físico diminui a concentração de citocinas inflamatórias e aumenta as citocinas anti-inflamatórias no músculo esquelético em idosos (Petersen; Pedersen, 2005). No entanto, a intensidade de esforço usada no TC, para os animais D-GAL, pode ter contribuído para o aumento na concentração de IL-6 e diminuição de IL-10 no músculo sóleo devido ao enfraquecimento das defesas antioxidantes e desequilíbrio redox celular (Leite *et al.*, 2015).

As regiões cerebrais do hipocampo e do córtex frontal são essenciais para a formação da memória de curto e longo prazo e têm sido amplamente prejudicadas no processo de envelhecimento (Heisz; Waddington, 2024).

O cérebro é um órgão que demanda uma grande quantidade de energia em forma de ATP. O desequilíbrio entre a defesa antioxidante e a oxidação durante

a respiração celular, pode levar ao aumento da formação de EROS (Espécies reativas ao oxigênio), estresse oxidativo e prejuízo redox celular (Cui *et al.*, 2006; Wang; Michaelis *et al.*, 2010). Estudos anteriores com roedores, utilizando a mesma dosagem de D-GAL, mostraram efeitos deletérios na memória, avaliada pelo teste de RON (Duan *et al.*, 2017). Esta deterioração na memória se deu em resposta às alterações morfológicas causadas por D-GAL no hipocampo, com perda sináptica, e disfunção mitocondrial (Chiroma *et al.*, 2019).

Nossos resultados mostraram que a memória de curto prazo foi prejudicada pela ação da D-galactose e restauradas pelo treinamento físico combinado (TC) e pela suplementação de flavonóis de cacau. De fato, a suplementação de flavonóis *per se*, e exerce efeito protetor sobre a memória (Van Praag *et al.*, 2007; Brickham *et al.*, 2014; Lalonde; Strazielle, 2023). Concordando com nossos achados, em estudo anterior de Bisson *et al.* (2008), a suplementação de 24 mg⁻¹.kg⁻¹ dia⁻¹ de extrato polifenólico de cacau em pó por 12 meses, em ratos Wistar idosos, melhorou a memória avaliada pelo teste de labirinto aquático. Da mesma forma, outra pesquisa com ratos Sprague-Dawley utilizando D-GAL (300 mg.3ml.kg) por 12 semanas, mostrou que uma dieta mista de cacau em pó 10% (baixa [cacau]) e 16% (alta [cacau]) por 8 semanas diminuiu o estresse oxidativo e aumentou os níveis antioxidantes de catalase (CAT) no cérebro (Yoo e Kim *et al.*, 2021).

Relacionado ao efeito do TC sobre a memória em nosso estudo, nossos resultados corroboram estudos anteriores, realizados em animais envelhecidos por D-GAL, que realizaram treinamento combinado de força em intensidades de 50% a 100% da massa corporal em escada vertical, e treinamento aeróbico de natação com duração de 60 minutos por 42 dias, três vezes por semana em dias alternados. Os animais melhoraram a memória de curto prazo avaliada pelo teste MRO, o que pode ter ocorrido, devido ao aumento da enzima antioxidante glutatona no córtex cerebral e aumento da neurotrofina IGF-1 sérica, que pode atravessar a barreira hematoencefálica e auxiliar na neurogênese e, consequentemente na manutenção da memória (Ozbeyli *et al.*, 2017). Novamente, salientamos que este é o primeiro estudo a mostrar os efeitos do TC e da suplementação de flavonóis do cacau sobre a memória em modelo de envelhecimento por D-Gal.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é uma proteína neurotrófica expressa no Sistema Nervoso Central (SNC) em neurônios,

principalmente no hipocampo, promovendo neurogênese, sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica, auxiliando na formação da memória em indivíduos saudáveis (Liu; Nusslock, 2018). Por outro lado, a baixa concentração dessa neurotrofina no SNC está relacionada ao comprometimento cognitivo leve e às doenças neurodegenerativas, incluindo doença de Alzheimer (Belviranli; Okudan, 2019; Li *et al.*, 2022).

O treinamento físico aeróbico, e o treinamento de força muscular, têm sido descritos como benéficos para o aumento da concentração de BDNF no hipocampo (Belviranli; Okudan, 2019; Heisz; Waddington, 2024). Esse aumento pode ocorrer pela ativação da via de sinalização do receptor de tropomiosina quinase B - TRKB. O BDNF se liga ao seu receptor de maior afinidade, o TRKB, que sofre autofosforilação, ativando diversas cascatas de sinalização que ativam o fator de transcrição CREB, o qual regula diversos genes relacionados à regulação da homeostase neuronal (Liu; Nusslock, 2018).

Os flavonóis do cacau podem igualmente promover a expressão de BDNF no cérebro, pela ativação da via de sinalização de transcrição CREB e, conseqüentemente, de sua proteína alvo, o BDNF (Spencer *et al.*, 2010; Sokolov *et al.*, 2013).

Em nosso estudo, o nível de BDNF no hipocampo estava mais elevado apenas no grupo que realizou o treinamento físico (TC), quando comparado ao grupo REP. PLA. Nossos resultados corroboram os de Vilela *et al.*, (2017) que utilizando ratos idosos, mostraram que o treinamento aeróbico e de força, de forma isolada, por oito semanas aumentaram as concentrações de BDNF pela ativação do receptor neurotrófico P75NTR e da ligação do elemento de resposta ao cAMP (CREB).

Avaliamos o perfil imunoquímico dos ratos que realizaram TC e/ou foram suplementados com flavonóis do cacau. Nossos resultados demonstraram que o *status* inflamatório, avaliado a partir das concentrações das citocinas pró (IL-1 β , TNF e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10) no hipocampo e córtex frontal, não foi alterado pelo TC e/ou suplementação com flavonóis do cacau. Exceto no hipocampo, no qual o nível da citocina pró-inflamatória IL-6 foi diminuída, mostrando efeitos aditivos em comparação ao grupo treinado *per si* e ao grupo REP. CACAU.

Nossos dados corroboram com estudos anteriores, que mostraram benefícios do treinamento físico para a atenuação da neuroinflamação (Lovatel *et al.*,

2013; Lin *et al.*, 2020; Jeong *et al.*, 2021). Além disso também estão em concordância com estudos indicando que, o treinamento físico, quando associado ao uso de flavonóis do cacau pode inibir a ativação de NF- κ B e do complexo enzimático IK β (IKK1/IKK2/IKKB) envolvido na resposta celular à inflamação e reduzir a expressão de enzimas COX-2 e LOX envolvidas na síntese de citocinas inflamatórias, pela ação dos monômeros catequina e epicatequina (Ellinger *et al.*, 2016; Goya *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2021).

Em nosso estudo, hipotetizamos que ocorreria uma diminuição na concentração das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) e aumento na concentração da citocina anti-inflamatória avaliada (IL-10) no cérebro em resposta ao TC e/ou à suplementação de flavonóis do cacau *per si*.

Estudo em ratos Wistar idosos de 24 meses de idade mostrou que o treinamento de força em escada, ou aeróbico em esteira, com duração de oito semanas, levou ao aumento da concentração de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) no hipocampo dos animais que treinaram força. Além disso, o estudo revelou que o grupo que realizou treinamento aeróbico não diferiu quanto à concentração de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo, em relação ao grupo não treinado, entretanto, sem prejudicar a memória (Vilela *et al.*, 2017). Além disso, estudos anteriores relataram que ratos idosos que realizaram treinamento de natação ou esteira, de intensidade moderada, tiveram suas concentrações de citocinas inflamatórias, tanto no nível central, quanto periférico aumentadas (Gomes Da Silva *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2020).

Baseado nestes estudos, podemos hipotetizar que as concentrações de citocinas inflamatórias no hipocampo e córtex frontal encontrado em nossos resultados podem não ter interferido para a manutenção da memória.

4.4 CONCLUSÃO ESTUDO 2

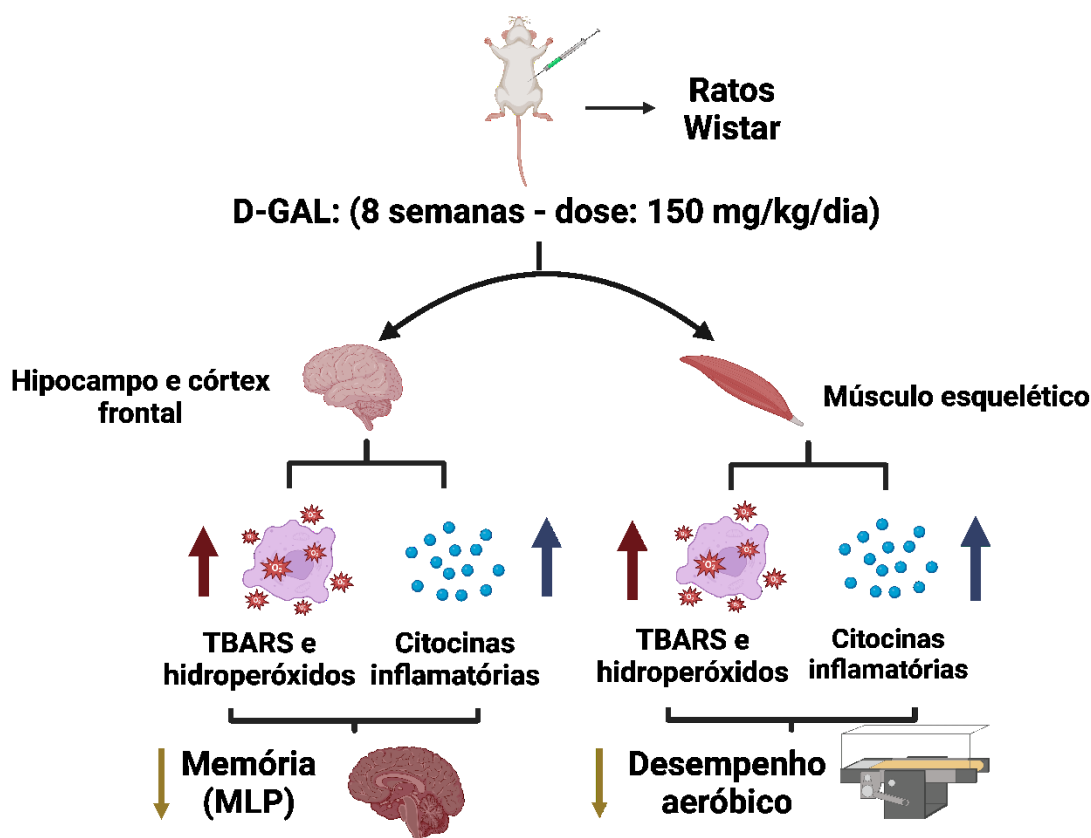
A suplementação crônica de flavonóis de cacau, administrada ao longo de oito semanas, demonstrou ser eficaz na atenuação da disfunção cognitiva relacionada à memória de curto prazo, ao mesmo tempo em que reduziu a inflamação no músculo sóleo. Por sua vez, o treinamento físico *per si* resultou em melhorias significativas no desempenho físico aeróbico e de força muscular, além de ter um impacto positivo na função da memória, evidenciado pelo aumento do nível de BDNF no hipocampo.

De forma complementar, a associação do treinamento físico com a suplementação de flavonóis do cacau demonstrou uma eficácia ainda maior na redução da inflamação no hipocampo de ratos administrados com D-Galactose. Esses resultados indicam que a combinação de treinamento físico e suplementação com flavonóis de cacau pode representar uma estratégia promissora para mitigar os efeitos adversos do envelhecimento em um modelo experimental em ratos, tanto em termos de desempenho físico quanto de saúde cognitiva.

4.5 CONCLUSÃO GERAL:

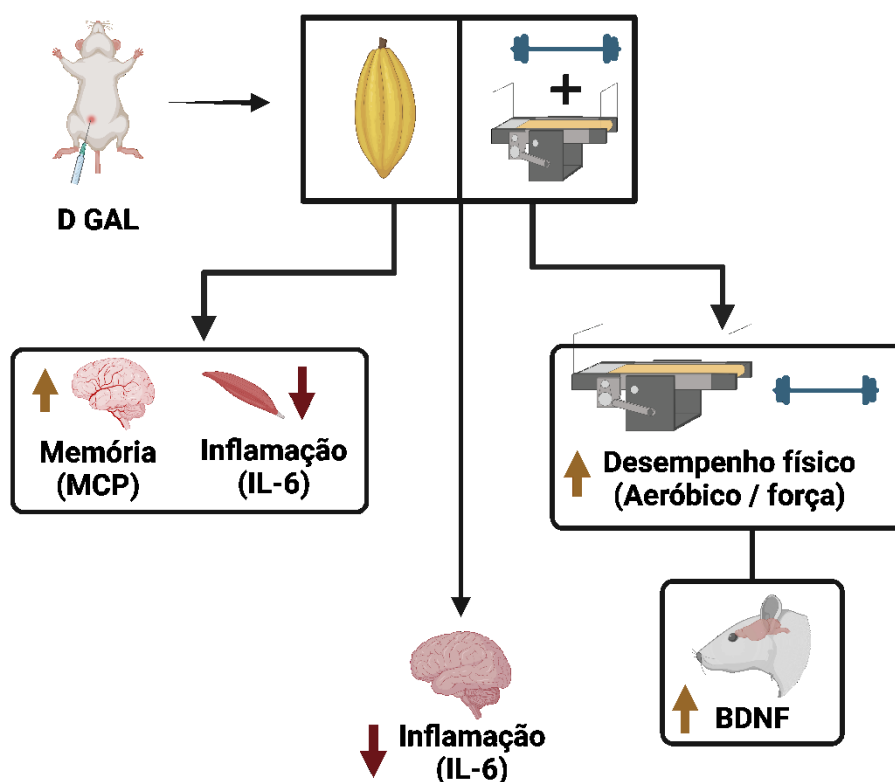
Estudo 1:

Figura 6 – O diagrama esquemático ilustra os efeitos deletérios causados pela D-GAL no cérebro (Hipocampo e córtex frontal) e músculo esquelético (Sóleo e EDL) de ratos, promovendo aumento do estresse oxidativo (TBARS e hidroperóxidos de lipídios) e do *milieu* pró-inflamatório nesses tecidos, culminando na diminuição do desempenho aeróbico ($VO_{2\text{pico}}$, TTE e capacidade de realizar trabalho) e da memória de longo prazo (MLP).



Estudo 2:

Figura 2 – O diagrama esquemático ilustra os benefícios da suplementação de flavonóis do cacau *per si* na memória de curto prazo e na redução da inflamação de IL-6 no músculo sóleo. Além disso, destaca-se o efeito do treinamento físico combinado, que resultou no aumento do desempenho aeróbico (TTE, Vpico e capacidade de realizar trabalho) e na elevação do BDNF no hipocampo, o que impactou positivamente a memória. Notavelmente, a combinação do treinamento físico combinado com a suplementação de flavonóis do cacau demonstrou eficácia em reduzir a inflamação de IL-6 no hipocampo de ratos D-GAL.



Fonte: Próprio autor

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, P. B.; GROSS, K. C. Hidden sources of galactose in the environment. **Eur J Pediatr.**, [s. l.], v.154, p. 87–92, 1995.
- APROTOSOAIE, A.C.; MIRON, A.; TRIFAN, A.; LUCA, V.S.; COSTACHE, I.J. The cardiovascular effects of cocoa polyphenols – an overview. **Diseases**, v. 4, n. 39, p. 1-25, 2016. DOI: 10.3390/diseases4040039.
- AGUILAR DIAZ DE LEON J.; BORGES, C. R. Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. **J Vis Exp.**, [s. l.], n. 159, p.10.3791/61122, 2020.
- AMEEN, O.; SAMAKA, R. M.; ABO-ELSOUD, R. A. A. Metformin alleviates neurocognitive impairment in aging via activation of AMPK/BDNF/PI3K pathway. **Sci Rep.**, [s. l.], v. 12, n. 1, p.17084, 2022.
- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev.**, [s. l.], v. 2014, p. 360438, 2014.
- AYAZ, M.; SADIQ, A.; JUNAID, M.; *et al.* Flavonoids as Prospective Neuroprotectants and Their Therapeutic Propensity in Aging Associated Neurological Disorders. **Front Aging Neurosci.**, [s. l.], v. 11, p.155, 2019.
- AZMAN, K. F.; ZAKARIA, R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. **Biogerontology**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 763-782, 2019.
- BANJI, O. J.; BANJI, D.; CH, K. Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain. **Food Chem Toxicol.**, [s. l.], v. 74, p. 51-9, 2014.
- BATISTA JUNIOR, M. L.; LOPES, R. D.; SEELAENDER, M. C.; LOPES, A. C. Anti-inflammatory effect of physical training in heart failure: role of TNF-alpha and IL-10. **Arq Bras Cardiol.**, [s. l.], v. 93, n. 6, p. 643-51, 2009.
- BELLETTINI-SANTOS, T.; GARCEZ, M. L.; MINA, F.; *et al.* Vitamin D3 improves spatial memory and modulates cytokine levels in aged rats. **Metab Brain Dis.**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 1155-1166, 2023.
- BELVIRANLI, M.; OKUDAN, N. Voluntary, involuntary and forced exercises almost equally reverse behavioral impairment by regulating hippocampal neurotrophic factors and oxidative stress in experimental Alzheimer's disease model. **Behav Brain Res.**, [s. l.], v. 364, p. 245-255, 2019.
- BEKTAS, A.; SCHURMAN, S. H.; SEN, R.; FERRUCCI, L. human T cell immunosenescence and inflammation in aging. **J Leukoc Biol.**, v. 102, p. 977–88, 2017.

BETIKA, A. C.; C.; HEPPLER, B. AND R., T.; T.; HEPPLER. Determinants of VO₂ max decline with aging: an integrated perspective. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, [s. l.], v. 33, p. 130-140, 2008.

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

BISSON, J. F.; NEJDI, A.; ROZAN, P.; *et al.* Effects of long-term administration of a cocoa polyphenolic extract (Acticoa powder) on cognitive performances in aged rats. **Br J Nutr.**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 94-101, 2008.

BRICKMAN, A. M.; KHAN, U. A.; PROVENZANO, F. A.; *et al.* Enhancing dentate gyrus function with dietary flavanols improves cognition in older adults. **Nat Neurosci.**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 1798-803, 2014.

BUDNI, J.; PACHECO, R.; DA SILVA, S.; *et al.* Oral administration of d-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats. **Behav Brain Res.**, [s. l.], v. 302, p. 35-43, 2016.

CADORE, E. L.; PINTO, R. S.; LHULLIER, F. L. R.; *et al.* Physiological effects of concurrent training in elderly men. **Int J Sports Med.**, [s. l.], v. 31, n. 10, p. 689-697, 2010.

CARDOSO, A.; MAGANO, S.; MARRANA, F.; ANDRADE, J. P. D-Galactose High-Dose Administration Failed to Induce Accelerated Aging Changes in Neurogenesis, Anxiety, and Spatial Memory on Young Male Wistar Rats. **Rejuvenation Res.**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 497-507, 2015.

CASSILHAS, R. C.; ANTUNES, H. K. M.; TUFIK, S.; DE MELLO, M. T. Mood, anxiety, and serum IGF-1 in elderly men given 24 weeks of high resistance exercise. **Percept Mot Skills.**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 265-276, 2010.

CASSILHAS, R. C.; LEE, K. S.; FERNANDES, J.; *et al.* Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. **Neuroscience**, [s. l.], v. 202, p. 309-317, 2012.

CEBE, T.; YANAR, K.; ATUKEREN, P.; *et al.* A comprehensive study of myocardial redox homeostasis in naturally and mimetically aged rats. **Age**, [s. l.], v. 36, n. 6, p. 1-14, 2014.

CHANG, L.; LIU, X.; LIU, J.; *et al.* D-galactose induces a mitochondrial complex I deficiency in mouse skeletal muscle: potential benefits of nutrient combination in ameliorating muscle impairment. **J Med Food.**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 357-64, 2014.

CHEN, H. I.; OU, H. C.; CHEN, C. Y.; *et al.* Neuroprotective Effect of *Rhodiola crenulata* in D-Galactose-Induced Aging Model. **Am J Chin Med.**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 373-390, 2020.

CHEN, H.; LONG, Y.; GUO, L. Antiaging effect of inula Britannica on aging mouse model induced by D-galactose. **Evid Based Complement Altern Med.**, [s. l.], 6049083, 2016.

CHEN, P.; CHEN, F.; ZHOU, B. Antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of ellagic acid in liver and brain of rats treated by D-galactose. **Sci Rep.** 2018 Jan 23;8(1):1465. doi: 10.1038/s41598-018-19732-0. Erratum in: Sci Rep. 2019 Dec 10;9(1):19129. PMID: 29362375; PMCID: PMC5780521.

CHIROMA, S. M.; HIDAYAT BAHARULDIN, M. T.; MAT TAIB, C. N.; Protective effect of Centella asiatica against D-galactose and aluminium chloride induced rats: Behavioral and ultrastructural approaches. **Biomed Pharmacother.**, [s. l.], v. 109, p. 853-864, 2019.

CHODZKO-ZAJKO, W. J.; PROCTOR, D. N.; FIATARONE SINGH, M. A.; *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. **Med Sci Sports Exerc.**, [s. l.], v. 41, p. 1510–530, 2009.

CONTI, F. F.; BRITO, J. O.; BERNARDES, N.; *et al.* Positive effect of combined exercise training in a model of metabolic syndrome and menopause: autonomic, inflammatory, and oxidative stress evaluations. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, [s. l.], v. 309, n. 12, p. R1532-R1539, 2015.

COOPER, K. A.; DONOVAN, J. L.; WATERHOUSE, A. L.; *et al.* Cocoa and health: a decade of research. **Br J Nutr.**, [s. l.], v. 99, n. 1, p. 1-11, 2008.

CORR, L. D.; FIELD, A.; PUFAL, D.; *et al.* The effects of cocoa flavanols on indices of muscle recovery and exercise performance: a narrative review. **BMC Sports Sci Med Rehabil.**, [s. l.], v. 13, n. 90, 2021.

CRUNFLI, F.; VRECHI, T. A.; COSTA, A. P.; *et al.* Cannabinoid Receptor Type 1 Agonist ACEA Improves Cognitive Deficit on STZ-Induced Neurotoxicity Through Apoptosis Pathway and NO Modulation. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 516–529, 2019.

CUI, X. U.; ZUO, P.; ZHANG, Q.; *et al.* Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: Protective effects of R- α -lipoic acid. **J Neurosci Res.**, [s. l.], v. 83, n. 8, p. 1584-1590, 2006.

DHINGRA, S.; SHARMA, A. K.; ARORA, R. C.; SLEZAK, J.; SINGAL, P. K. IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. **Cardiovasc Res.** 2009 Apr 1;82(1):59-66. doi: 10.1093/cvr/cvp040. Epub 2009 Jan 30. PMID: 19181934.

DAGDEVIREN, S.; JUNG, D. Y.; FRIEDLINE, R. H.; *et al.* IL-10 prevents aging-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle. **FASEB J.**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 701-710, 2017.

DAUSSIN, F. N.; CUILLERIER, A.; TOURON, J.; *et al.* Dietary Cocoa Flavanols Enhance Mitochondrial Function in Skeletal Muscle and Modify Whole-Body Metabolism in Healthy Mice. **Nutrients.**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 3466, 2021.

DECROIX, L.; SOARES, D. D.; MEEUSEN, R.; *et al.* Cocoa flavanol supplementation and exercise: a systematic review. **Sports Medicine**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 867-892, 2018.

DISABATO, D. J.; QUAN, N.; GODBOUT, J. P. Neuroinflammation: the devil is in the details. **J Neurochem.**, [s. l.], v. 139 Suppl, n. 2, p. 136-153, 2016.

DIAS, DANIELLE DA SILVA *et al.* Impact of combined exercise training on the development of cardiometabolic and neuroimmune complications induced by fructose consumption in hypertensive rats. **PloS one.**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. e0233785, 2020.

DUAN, D-D.; WANG, K-X.; ZHOU, Y-Z.; *et al.* Baicalein exerts beneficial effects in d-galactose-induced aging rats through attenuation of inflammation and metabolic dysfunction. **Rejuvenation res.**, Larchmont, NY, v. 20, n. 6, p. 506-516, 2017.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P. Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 181-201, 2011.

ELLINGER, S.; STEHLE, P. Impact of Cocoa Consumption on Inflammation Processes-A Critical Review of Randomized Controlled Trials. **Nutrients.**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 321, 2016.

FAN, J.; YANG, X.; LI, J.; *et al.* Spermidine coupled with exercise rescues skeletal muscle atrophy from D-gal-induced aging rats through enhanced autophagy and reduced apoptosis via AMPK-FOXO3a signal pathway. **Oncotarget.**, [s. l.], v. 14, n. 8, p. 17475-17490, 2017.

FERNÁNDEZ-MILLÁN, E.; CORDERO-HERRERA, I.; RAMOS, S.; *et al.* Cocoa-rich diet attenuates beta cell mass loss and function in young Zucker diabetic fatty rats by preventing oxidative stress and beta cell apoptosis. **Molecular nutrition & food research**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 820-824, 2015.

FRAGALA, M. S.; CADORE, E. L.; DORGO, S.; *et al.* Resistance Training for Older Adults: Position Statement From the National Strength and Conditioning Association. **J Strength Cond Res.**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 2019-2052, 2019.

FRANCESCHI, C.; GARAGNANI, P.; PARINI, P.; *et al.* Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. **Nat Rev Endocrinol.**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 576-590, 2018.

GARATACHEA, N.; PAREJA-GALEANO, H.; SANCHIS-GOMAR, F.; *et al.* Exercise attenuates the major hallmarks of aging. **Rejuvenation Research**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 57-89, 2015.

GARCEZ, M. L.; CASSOMA, R. C. S.; MINA, F.; Folic acid prevents habituation memory impairment and oxidative stress in an aging model induced by D-galactose. **Metab Brain Dis.**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 213-224, 2021.

GARCIA-YU, I. A.; GARCIA-ORTIZ, L.; GOMEZ-MARCOS, M. A.; *et al.* Effects of Cocoa-Rich Chocolate on Blood Pressure, Cardiovascular Risk Factors, and Arterial Stiffness in Postmenopausal Women: A Randomized Clinical Trial. **Nutrients.**, [s. l.], v. 12, n. 6, p.1758, 2020.

GERMAN, I. J. S.; POMINI K. T.; ANDREO, J. C.; *et al.* New Trends to Treat Muscular Atrophy: A Systematic Review of Epicatechin. **Nutrients.**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 326, 2024.

GOMES DA SILVA, S.; SIMÕES, P. S. R., MORTARA, R. A. Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats. **J Neuroinflammation**, [s. l.], v. 10, p. 10–61, 2013.

GOMES, F. G. N.; FERNANDES, J.; CAMPOS, D. V.; *et al.* The beneficial effects of strength exercise on hippocampal cell proliferation and apoptotic signaling is impaired by anabolic androgenic steroids. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 50, p. 106-117, 2014.

GOMES, M. J.; MARTINEZ, P. F.; PAGAN, L. U.; *et al.* Skeletal muscle aging: Influence of oxidative stress and physical exercise. **Oncotarget.**, [s. l.], v. 8, p. 20428, 2017.

GOYA, L.; MARTÍN, M. Á., SARRIÁ, B.; RAMOS, S.; MATEOS, R.; BRAVO L. Effect of Cocoa and Its Flavonoids on Biomarkers of Inflammation: Studies of Cell Culture, Animals and Humans. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2016.

HACHAM, M.; WHITE, R. M.; ARGOV, S.; SEGAL, S.; APTE, R. N. Interleukin-6 and interleukin-10 are expressed in organs of normal young and old mice. **Eur. Cytokine Netw.**, [s. l.], v. 15, p. 37–46, 2004.

HENRY, C. J.; HUANG, Y.; WYNNE, A. M.; GODBOUT, J. P. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. **Brain Behav Immun** 2009, 23: 309-317.

HUANG, Y.; HENRY, C. J.; DANTZER, R.; JOHNSON, R. W.; GODBOUT, J. P. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. **Neurobiol Aging** 2008, 29: 1744-1753.

HUANG, Z. B., SHENG, G. Q. Interleukin-1 β with learning and memory. **Neurosci Bull.** 2010 Dec;26(6):455-68. doi: 10.1007/s12264-010-6023-5. PMID: 21113196; PMCID: PMC5560336.

HEISS, C.; DEJAM, A.; KLEINBONGARD, P.; *et al.* Vascular effects of cocoa rich in flavan-3-ols. **Jama**, [s. l.], v. 290, n. 8, p. 1030-1031, 2003.

HEISZ, J. J.; WADDINGTON, E. E. The Principles of Exercise Prescription for Brain Health in Aging. **Exercise, Sport, and Movement.**, [s. l.], v. 2, n. 1, p 1-5, 2024.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Projeção da população 2022**. Rio de Janeiro: IBGE, 2022.

ISAAC, A. R.; LIMA-FILHO, R. A. S.; LOURENÇO, M. V. How does the skeletal muscle communicate with the brain in health and disease? **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 197, 108744, 2021.

IZQUIERDO M.; MERCHANT, R. A.; MORLEY, J. E.; *et al.* International Exercise Recommendations in Older Adults (ICFSR): Expert Consensus Guidelines. **J Nutr Health Aging.**, [s. l.], v. 25, n. 7, p. 824-853, 2021.

JEONG, JAE-HOON *et al.* Neuroprotective Benefits of Exercise and MitoQ on Memory Function, Mitochondrial Dynamics, Oxidative Stress, and Neuroinflammation in D-Galactose-Induced Aging Rats. **Brain Sciences**, Basel, Switzerland, v. 11, n. 2, 2021.

KAMAT, P. K. Streptozotocin induced Alzheimer's disease like changes and the underlying neural degeneration and regeneration mechanism. **Neural regeneration research**, [s. l.], v. 10, n. 7, p. 1050, 2015.

KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. **Clinical Chemistry**. 3. ed. St. Louis: Mosby, 1996.

KOU, X.; LI, J.; LIU, X.; YANG, X.; FAN, J.; CHEN, N. Ampelopsin attenuates the atrophy of skeletal muscle from d-gal-induced aging rats through activating AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling cascade. **Biomed Pharmacother.**, [s. l.], v. 90, p. 311-320, 2017.

KUMARI, M.; DASRIYA, V. L.; NATARAJ, B. H.; NAGPAL, R.; BEHARE, P. V. Lactacisaccharibacillus rhamnosus-Derived Exopolysaccharide Attenuates D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Inflammatory Brain Injury and Modulates Gut Microbiota in a Mouse Model. **Microorganisms.**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 2046, 2022.

KURO-O, M.; MATSUMURA, Y.; AIZAWA, H.; *et al.* Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. **Nature**, [s. l.], v. 390, n. 6655, p. 45-51, 1997.

LALONDE, R.; STRAZIELLE, C. Cocoa Flavanols and the Aging Brain. **Curr Aging Sci.**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 2-11, 2023.

LAVIN, K. M.; ROBERTS, B. M.; FRY, C. S.; MORO, T.; RASMUSSEN, B. B.; BAMMAN, M. M. The Importance of Resistance Exercise Training to Combat Neuromuscular Aging. **Physiology**, Bethesda, v. 34, n. 2, p.112-122, 2019.

LEE, J. Y.; PAIK, I. Y.; KIM, J. Y. Voluntary exercise reverses immune aging induced by oxidative stress in aging mice. **Exp Gerontol.**, [s. l.], v. 115, p.148-154, 2019.

LEITE, M. R.; CECHELLA, J. L.; MANTOVANI, A. C.; *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.**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 119-23, 2015.

LI G, PESKIND ER, MILLARD SP, CHI P.; *et al.* Cerebrospinal fluid concentration of brain-derived neurotrophic factor and cognitive function in non-demented subjects. **PloS one**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. e5424, 2009.

LI, X.; LI, C.; ZHANG, W.; *et al.* Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. **Sig Transduct Target Ther.**, [s. l.], v. 8, n. 239, 2023.

LI, Y.; LI, F.; QIN, D.; *et al.* The role of brain derived neurotrophic factor in central nervous system. **Front Aging Neurosci.**, [s. l.], v. 14, p. 986443, 2022.

LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clin Interv Aging.**, [s. l.], v. 13, p. 757-772, 2018.

LIN, J-Y.; KUO, W-W.; BASKARAN, R.; *et al.* Swimming exercise stimulates IGF1/PI3K/Akt and AMPK/SIRT1/PGC1 α survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus. **Aging.**, Albany, NY, v. 12, n. 8, p. 6852, 2020.

LIU, C.; HU, J.; MAO, Z.; *et al.* Acute kidney injury and inflammatory response of sepsis following cecal ligation and puncture in D-galactose-induced aging rats. **Clin Interv Aging.**, [s. l.], v. 12, p. 593–602, 2017.

LIU, P. Z.; NUSSLOCK, R. Exercise-Mediated Neurogenesis in the Hippocampus via BDNF. **Front Neurosci.**, [s. l.], v. 12 n. 52, 2018. doi: 10.3389/fnins.2018.00052. PMID: 29467613; PMCID: PMC5808288.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The hallmarks of aging. **Cell.**, [s. l.], v. 153, n. 6, p. 1194-217, 2013.

LOVATEL, G. A.; ELSNER, V. R.; BERTOLDI, K.; *et al.* Treadmill exercise induces age-related changes in aversive memory, neuroinflammatory and epigenetic processes in the rat hippocampus. **Neurobiol Learn Mem.**, [s. l.], v. 101, p. 94-102, 2013.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MAGALHÃES, C. O. D. e; OLIVEIRA, L. R. S. de; SANTOS, S. T.; *et al.* Nandrolone decanoate reduces the positive effects of resistance training on cognition, anxious behavior, and hippocampal morphology in rats. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. e10511830600, 2022.

MA JC, DUAN MJ, SUN LL.; *et al.* Cardiac over-expression of microRNA-1 induces impairment of cognition in mice. **Neuroscience**, [s. l.], v. 299, p. 66-78, 2015.

MASSARO, M.; SCODITTI, E.; CARLUCCIO, M. A.; KALTSATOU, A.; CICCHELLA, A. Effect of Cocoa Products and Its Polyphenolic Constituents on Exercise Performance and Exercise-Induced Muscle Damage and Inflammation: A Review of Clinical Trials. **Nutrients.**, [s. l.], v. 11, n. 7, 2019.

MELO, B. P.; ZACARIAS, A. C.; OLIVEIRA, J. C. C.; *et al.* Combination of Aerobic Training and Cocoa Flavanols as Effective Therapies to Reduce Metabolic and Inflammatory Disruptions in Insulin-Resistant Rats: The Exercise, Cocoa, and Diabetes Study. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 89-101, 2022.

MITTAL S. K.; ROCHE P. A. Suppression of antigen presentation by IL-10. **Curr. Opin. Immunol.**, [s. l.], v. 34, p. 22–27, 2015.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, [s. l.], v. 19, p. 683–765, 2001.

MORAVA, E. Galactose supplementation in phosphoglucomutase-1 deficiency; review and outlook for a novel treatable CDG. **Mol Genet Metab.**, [s. l.], v. 112, p. 275–279, 2014.

NAM, S. M.; SEO, M.; SEO, J. S.; *et al.* Ascorbic Acid Mitigates D-galactose-Induced Brain Aging by Increasing Hippocampal Neurogenesis and Improving Memory Function. **Nutrients.**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 176, 2019.

ÖZBEYLI, D.; SARI, G.; ÖZKAN, N.; *et al.* Protective effects of different exercise modalities in an Alzheimer's disease-like model. **Behav Brain Res.**, Amsterdam, v. 328, p. 159-177, 2017.

HERMANN, P. M.; WATSON, S. N.; WILDERING, W.C. Phospholipase A2—nexus of aging, oxidative stress, neuronal excitability, and functional decline of the aging nervous system? Insights from a snail model system of neuronal aging and age-associated memory impairment, **Front. Genet.** 5 (2014) 419. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00419>.

PANDEY, A. KRAUS, W. E.; BRUBAKER, P. H.; KITZMAN, D. W. Healthy Aging and Cardiovascular Function: Invasive Hemodynamics During Rest and Exercise in 104 Healthy Volunteers. **JACC Heart Fail.**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 111-121, 2020.

PARTADIREDDA, G.; KARIMA, N.; UTAMI, K. P.; *et al.* The Effects of Light and Moderate Intensity Exercise on the Femoral Bone and Cerebellum of d-Galactose-Exposed Rats. **Rejuvenation Res**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 20-30, 2019.

PERRONE, A.; GIOVINO, A.; BENNY, J.; MARTINELLI, F. Advanced glycation end products (AGEs): Biochemistry, signaling, analytical methods, and epigenetic effects. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, [s. l.], 3818196, 2020.

PETERSEN, A. M.; PEDERSEN, B. K. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol.**, [s. l.], v. 98, n. 4, p. 1154-62, 2005.

PRAKASH, M.; BASAVARAJ, B. V.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N. Biological functions of epicatechin: Plant cell to human cell health. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 52, p. 14–24, 2019.

PRÍMOLA-GOMES, T. N.; CAMPOS, L. A.; LAUTON-SANTOS, S.; *et al.* Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. **J Appl Physiol.**, [s. l.], v. 107, n. 2, p. 593-598, 2009.

RON-HAREL, N.; SCHWARTZ, M. Immune senescence and brain aging: can rejuvenation of immunity reverse memory loss? **Trends Neurosci.**, [s. l.], v. 32, p. 367–375, 2009.

ROJAS, J. J. *et al.* Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. **Experimental Neurology**, v. 241, n. 1, p. 25–33, 2013.

ROSS, R.; BLAIR, S. N.; ARENA, R.; CHURCH, T. S.; DESPRÉS, J-P.; FRANKLIN, B. A.; *et al.* Importance of Assessing Cardiorespiratory Fitness in Clinical Practice: A Case for Fitness as a Clinical Vital Sign: A Scientific Statement From the American Heart Association. **Circulation.**, [s. l.], v. 13, p.134, 2016.

ROSADO-PÉREZ, J.; MENDOZA-NÚÑEZ, V. M. Relationship Between Aerobic Capacity With Oxidative Stress and Inflammation Biomarkers in the Blood of Older Mexican Urban-Dwelling Population. **Dose Response**. 2018 Apr 29;16(2):1559325818773000. doi: 10.1177/1559325818773000. PMID: 29760603; PMCID: PMC5944145.

REHMAN, S. U.; SHAH, S. A.; ALI, T.; CHUNG, J. I.; KIM, M. O. Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. **Mol Neurobiol**. 2017 Jan;54(1):255-271. doi: 10.1007/s12035-015-9604-5. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26738855.

SADIGH-ETEGHAD, S.; MAJDI, A.; MCCANN, S. K.; *et al.* D-galactose-induced brain ageing model: a systematic review and meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices. **PloS one**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. e0184122, 2017.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007.

SAENNO, R.; DORNLAHORN, O.; ANOSRI, T.; *et al.* Caffeic Acid Alleviates Memory and Hippocampal Neurogenesis Deficits in Aging Rats Induced by D-Galactose. **Nutrients.**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 2169, 2022.

SCHRAGE, W. G.; EISENACH, J. H.; JOYNER, M. J. Ageing reduces nitric-oxide- and prostaglandin-mediated vasodilatation in exercising humans. **J Physiol.**, [s. l.], v. 579, p. 227–236, 2007.

SHEPARD, R. J. Maximal oxygen intake and independence in old age. **Br J Sports Med.**, [s. l.], v. 43, p.342–346, 2009.

SILVEIRA-RODRIGUES, J. G.; CAMPOS, B. T.; DE LIMA, A. T.; *et al.* Acute bouts of aerobic and resistance exercise similarly alter inhibitory control and response time while inversely modifying plasma BDNF concentrations in middle-aged and older adults with type 2 diabetes. **Exp Brain Res.**, [s. l.], n. 4, p. 1173-1183, 2023.

SOARES, A. D. N., WANNER, S. P., MORAIS, E. S. S.; *et al.* Supplementation with *Saccharomyces boulardii* Increases the Maximal Oxygen Consumption and Maximal Aerobic Speed Attained by Rats Subjected to an Incremental-Speed Exercise. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 10, 2010.

SOKOLOV, A. N.; PAVLOVA, M. A.; KLOSTERHALFEN, S.; *et al.* Chocolate and the brain: Neurobiological impact of cocoa flavanols on cognition and behavior. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, [s. l.], v. 37, n. 10, p. 2445-2453, 2013.

SONG, E. K.; PARK, H.; KIM, H. S. Additive effect of walnut and chokeberry on regulation of antioxidant enzyme gene expression and attenuation of lipid peroxidation in d-galactose-induced aging-mouse model. **Nutr Res.**, [s. l.], v. 70, p. 60-69, 2019.

SPENCER, J. P. The impact of fruit flavonoids on memory and cognition. **Br J Nutr.**, [s. l.], v. 104, n. S3, p. S40-S47, 2010.

SUEN, J.; THOMAS, J.; KRANZ, A.; *et al.* Effect of flavonoids on oxidative stress and inflammation in adults at risk of cardiovascular disease: a systematic review. **Healthcare**, Basel, v. 4, n. 3, p. 69, 2016.

SUN, K.; YANG, P.; ZHAO, R.; BAI, Y.; GUO, Z. Matrine Attenuates D-Galactose-Induced Aging-Related Behavior in Mice via Inhibition of Cellular Senescence and Oxidative Stress. **Oxid Med Cell Longev.**, [s. l.], v. 2018, p. 7108604, 2018.

TAKEDA, T.; HOSOKAWA, M.; HIGUCHI, K. Senescence-accelerated mouse (SAM): a novel murine model of senescence. **Exp Gerontol.**, [s. l.], v. 32, n. 1-2, 1997.

TAPIA-ARANCIBIA, L.; ALIAGA, E.; SILHOL, M.; ARANCIBIA, S. New insights into brain BDNF function in normal aging and Alzheimer disease. **Brain research reviews**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 201-220, 2008.

TIKHONOVA, M. A.; YU, C. H.; KOLOSOVA, N. G.; *et al.* Comparison of behavioral and biochemical deficits in rats with hereditary defined or D-galactose-induced accelerated senescence: evaluating the protective effects of diosgenin. **Pharmacol Biochem Behav.**, [s. l.], v. 120, p. 7-16, 2014.

TROMBETTA, IVANI CREDIDIO *et al.* Níveis séricos do BDNF na proteção cardiovascular e em resposta ao exercício. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 263-269, 2020.

ULLAH, F.; ALI, T.; ULLAH, N.; KIM, M. O. Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. **Neurochem Int.**, [s. l.], v. 90, p. 114-24, 2015.

UNITED NATIONS. **World Population Prospects 2022**. Department of Economic and Social Affairs Population Division, New York, 2022.

VAN PRAAG, H.; LUCERO, M. J.; YEO, G. W.; *et al.* Plant-derived flavanol (–) epicatechin enhances angiogenesis and retention of spatial memory in mice. **J. Neurosci.**, [s. l.], v. 27, p. 5869–5878, 2007.

VAUZOUR, D.; VAFEIADOU, K.; RODRIGUEZ-MATEOS, A. *et al.* The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. **Genes & nutrition**, [s. l.], v. 3, n. 3-4, p. 115-126, 2008.

VEDOVELLI, KELEM *et al.* Multimodal physical activity increases brain-derived neurotrophic factor levels and improves cognition in institutionalized older women. **Geroscience**, v. 39, n. 4, p. 407-417, 2017.

VILELA, T. C. *et al.* Strength and Aerobic Exercises Improve Spatial Memory in Aging Rats Through Stimulating Distinct Neuroplasticity Mechanisms. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 54, n. 10, p. 7928–7937, 2017.

WANG, H. H.; ZHANG, Y.; QU T. Q.; *et al.* Nobiletin Improves D-Galactose-Induced Aging Mice Skeletal Muscle Atrophy by Regulating Protein Homeostasis. **Nutrients.**, [s. l.], v. 15, n. 8, p. 1801, 2023.

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Front Aging Neurosci.**, [s. l.], v. 2, p. 12, 2010.

WANG, Z. Physiologic and biochemical changes of mimetic aging induced Dgalactose in rats. **Lab. Anim. Sci. Admin.**, [s. l.], v. 16, p. 23–25, 1999.

WATANABE, N.; INAGAWA, K.; SHIBATA, M.; OSAKABE, N. Flavan-3-ol fraction from cocoa powder promotes mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in mice. **Lipids Health Dis.**, [s. l.], v. 13, n. 64, 2014.

WU, D. M.; LU, J.; ZHENG, Y. L.; ZHOU, Z.; SHAN, Q.; MA, D. F. Purple sweet potato color repairs D-galactose-induced spatial learning and memory impairment by regulating the expression of synaptic proteins. **Neurobiol Learn Mem.**, [s. l.], v. 90, p. 19–27, 2008.

WU, X.; YU, X.; ZHU, N.; XU, M.; LI, Y. Beneficial effects of whey protein peptides on muscle loss in aging mice models. **Front Nutr.**, [s. l.], v. 9 p. 897821, 2022.

XINGHUA, L.; YINGYING, H.; SHUAI, W.; GUANGPING, L. Anti-aging Effect of Rutin in *Caenorhabditis elegans* and D-Gal-Induced Aging Mouse Model. **Dokl Biochem Biophys.**, [s. l.], v. 513, n. 1, p. 350-354, 2023.

XU, F. **Sub-acute toxicity of D-galactose.** *In*: Proceedings of the Second National Conference on Aging Research, Herbin, China, 1985.

YANAR, K.; SIMSEK, B.; ATUKEREN, P.; AYDIN, S.; CAKATAY, U. Is D-Galactose a Useful Agent for Accelerated Aging Model of Gastrocnemius and Soleus Muscle of Sprague-Dawley Rats? **Rejuvenation Res.**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 521-528, 2019.

YARIBEYGI, H.; PANAHI, Y.; JAVADI, B.; SAHEBKAR, A. The Underlying Role of Oxidative Stress in Neurodegeneration: A Mechanistic Review. **CNS Neurol Disord Drug Targets.**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 207-215, 2018.

YUAN, S.; LARSSON, S. C. Epidemiology of sarcopenia: Prevalence, risk factors, and consequences. **Metabolism.**, 2023.

YOO, H.; KIM, H. S. Cacao powder supplementation attenuates oxidative stress, cholinergic impairment, and apoptosis in D-galactose-induced aging rat brain. **Sci Rep.**, [s. l.], v. 11, p. 17914, 2021.

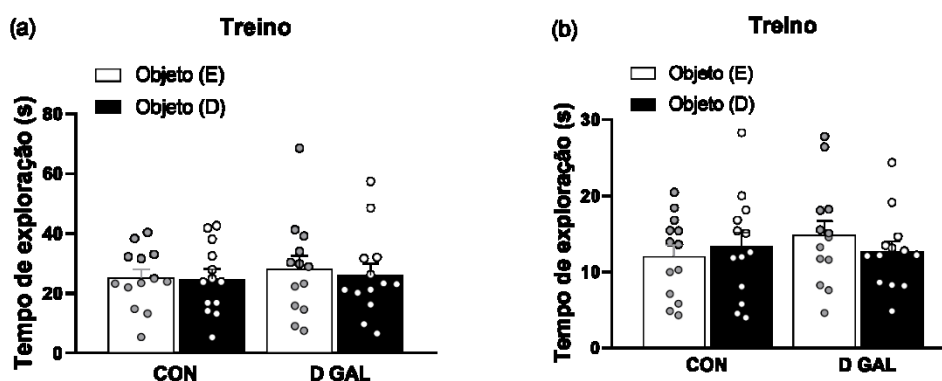
ZHAO, B.; REN, B.; GUO, R.; ZHANG, W.; MA, S.; YAO, Y.; YUAN, T.; LIU, Z.; LIU, X. Supplementation of lycopene attenuates oxidative stress induced neuroinflammation and cognitive impairment via Nrf2/NF- κ B transcriptional pathway. **Food Chem Toxicol.** 2017 Nov;109(Pt 1):505-516. doi: 10.1016/j.fct.2017.09.050. Epub 2017 Sep 30. PMID: 28974442.

ZHANG, B.; LIAN, W.; ZHAO, J.; WANG, Z.; LIU, A.; DU, G. DL0410 Alleviates Memory Impairment in D-Galactose-Induced Aging Rats by Suppressing Neuroinflammation via the TLR4/MyD88/NF- κ B Pathway. **Oxid Med Cell Longev.**, [s. l.], v. 2021, p. 6521146, 2021.

ZHANG, J.; GAO, Q.; GAO, J.; *et al.* Moderate-Intensity Intermittent Training Alters the DNA Methylation Pattern of PDE4D Gene in Hippocampus to Improve the Ability of Spatial Learning and Memory in Aging Rats Reduced by D-Galactose. **Brain Sci.**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 422, 2023.

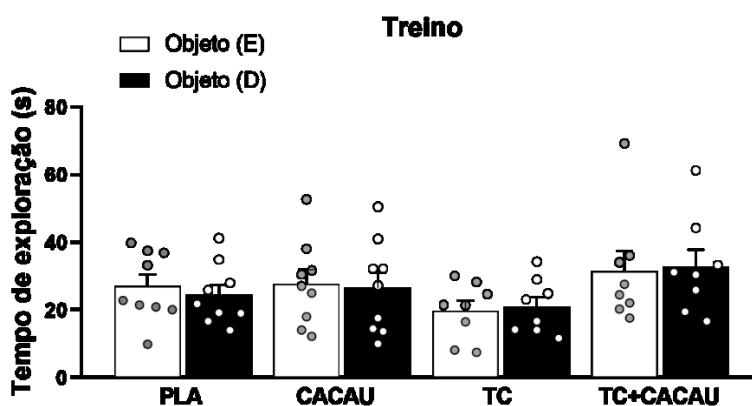
APÊNDICE A – Tempo de exploração entre dois objetos iguais na fase de treinamento do teste de memória (MRO)

Figura 23 - Treinamento com dois objetos iguais no período pré (a) e após (b) 8 semanas de D-GAL do estudo 1. Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Teste T de Student para comparação entre objetos. CON = Controle; D-GAL = D-Galactose. Grupos: CON (n=13) e D-GAL (n=13).



Fonte: Próprio autor

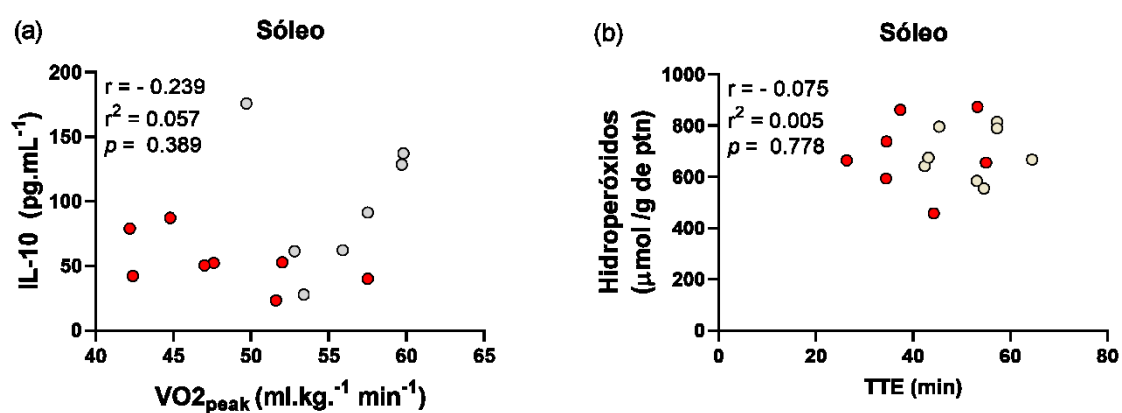
Figura 24 - Treinamento com dois objetos iguais após 8 semanas de treinamento físico combinado e/ou suplementação com flavonóis do cacau do estudo 2. Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Test T de Student para comparação entre objetos. PLA = placebo; CACAU = flavonóis do cacau; TC = treinamento físico combinado. Grupos: REP.PLA (n=9); REP. CACAU (n=9) e TC.PLA (n=8) e TC. CACAU (n=8).



Fonte: Próprio autor

APÊNDICE B – Correlação entre o nível de IL-10 no músculo esquelético sóleo e desempenho físico de VO₂pico e a concentração de hidroperóxidos de lipídios e tempo total de exercício (min)

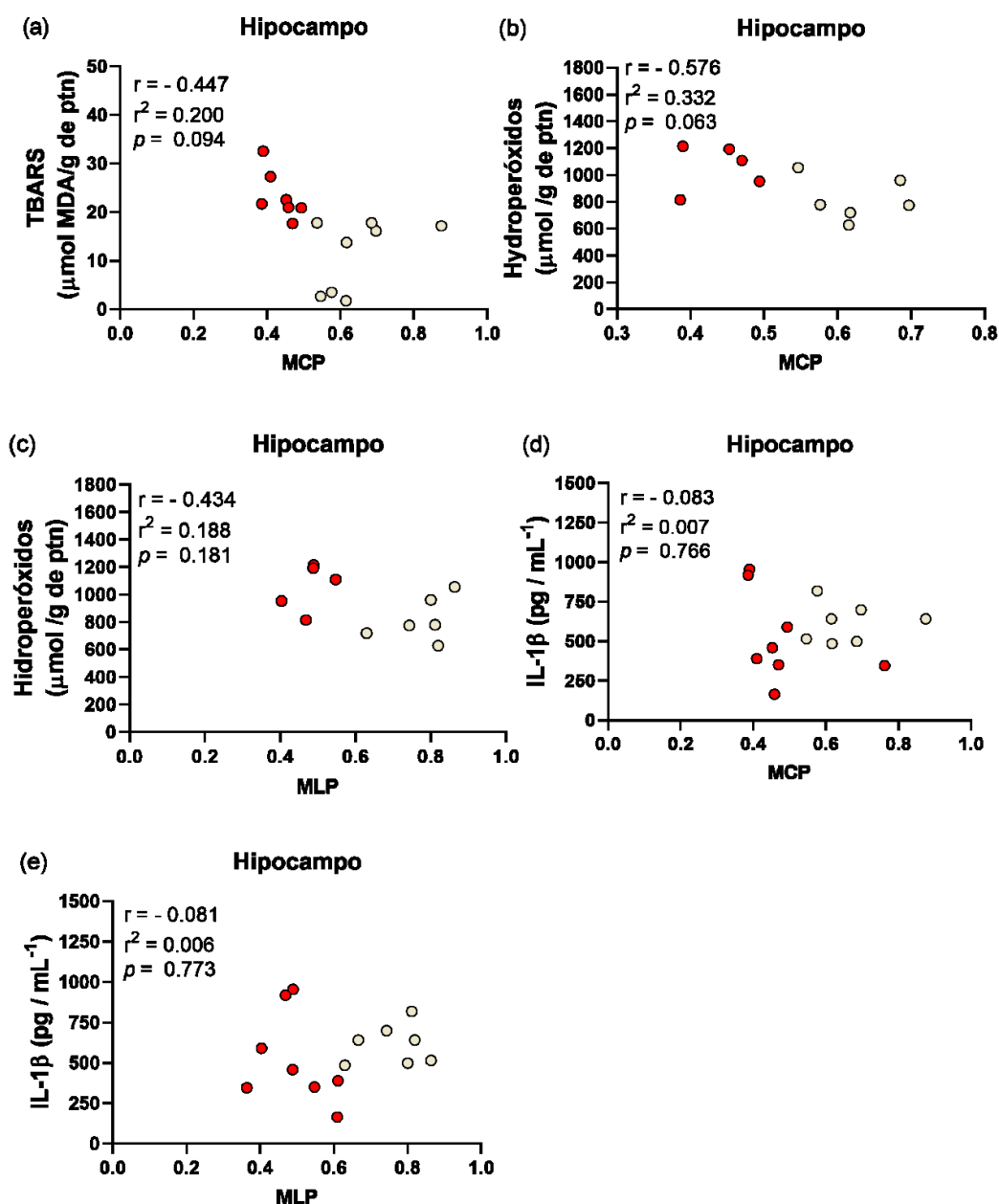
Figura 25 - Correlação entre a concentração de citocina anti-inflamatória IL-10 e VO₂pico (a) e a concentração de estresse oxidativo por hidroperóxidos e tempo total de exercício (TTE min) (b). Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Correlação de Pearson. Grupos: CON ($n = \leq 8$) e D-GAL ($n = \leq 8$).



Fonte: Próprio autor

APÊNDICE C – Correlação entre a concentração de TBARS, hidroperóxidos de lipídios e citocina pró-inflamatória IL-1 β no hipocampo e índice de reconhecimento da memória de curto (MCP) e longo prazo (MLP)

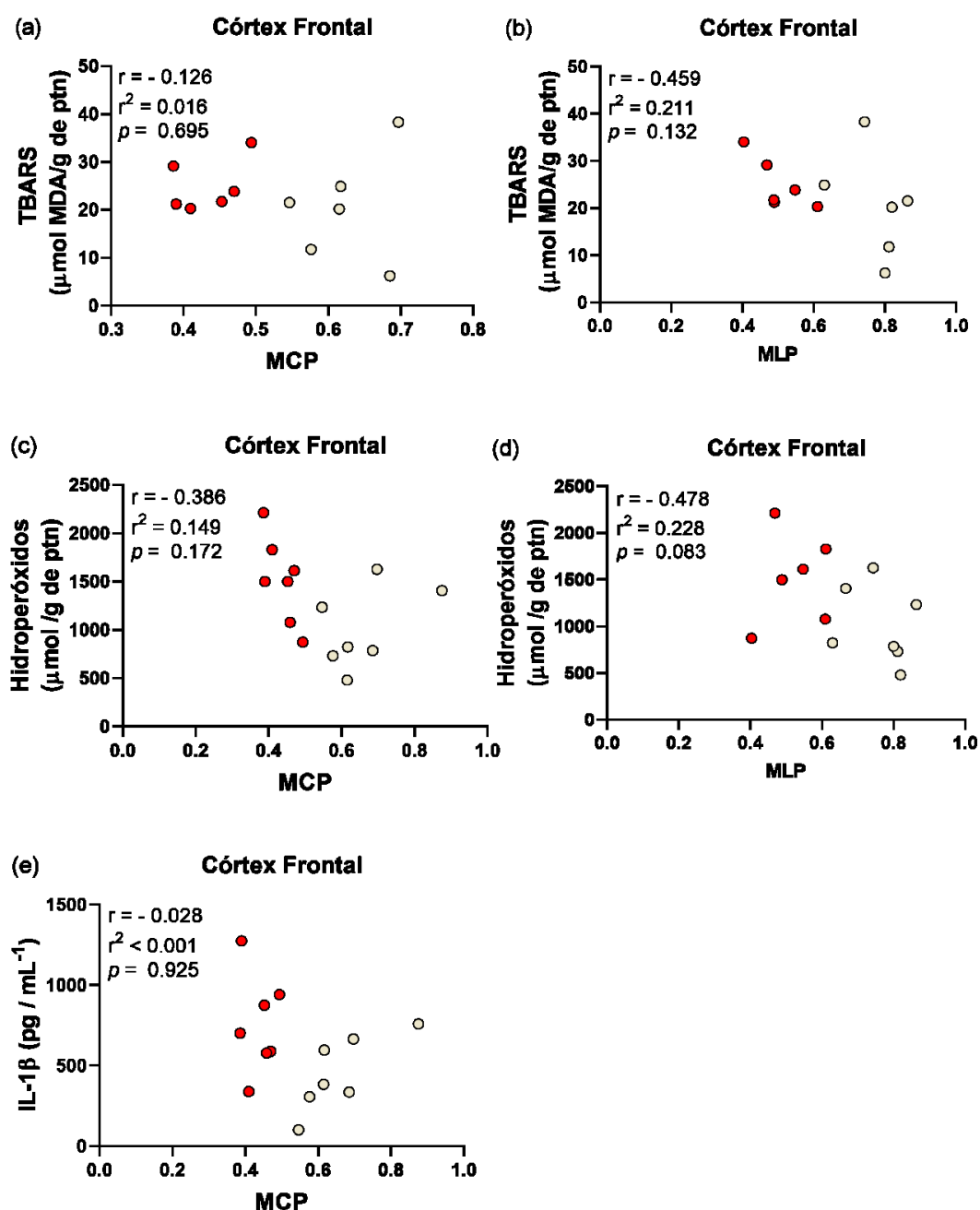
Figura 26 - Correlação entre a concentração de TBARS e índice de discriminação da memória de curto prazo (MCP) (a), hidroperóxidos de lipídios e índice de discriminação da memória de curto (MCP) (b) e longo prazo (MLP) (c) e citocina pró-inflamatória IL-1 β e índice de reconhecimento da memória de curto (MCP) (d) e longo prazo (MLP) (e). Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Correlação de Pearson. Grupos: CON ($n = \leq 8$) e D-GAL ($n = \leq 8$).



Fonte: Próprio autor

APÊNDICE D – Correlação entre a concentração de TBARS, hidroperóxidos de lipídios e citocina pró-inflamatória IL-1 β no córtex frontal e índice de reconhecimento da memória de curto (MCP) e longo prazo (MLP)

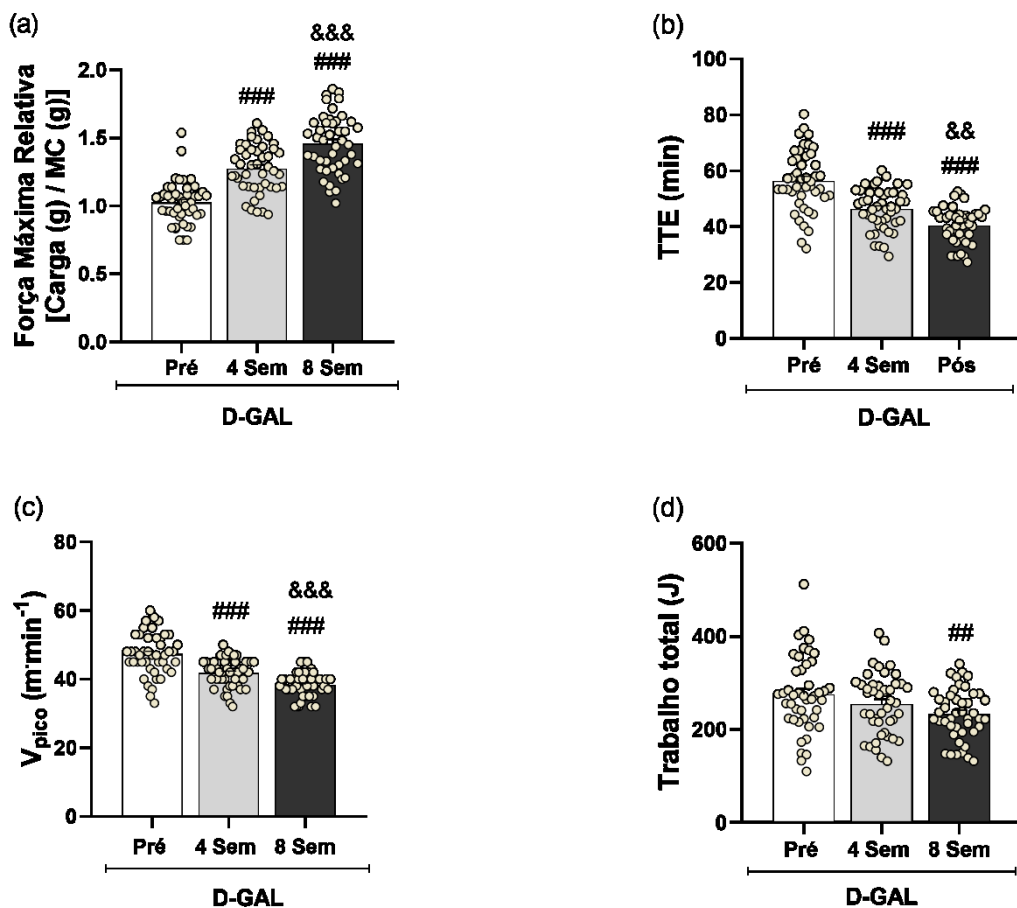
Figura 27 - Correlação entre a concentração de TBARS e o índice de reconhecimento de objetos da memória de curto (MCP) (a) e longo prazo (MLP) (b), hidroperóxidos de lipídios e o índice de reconhecimento da memória de curto (MCP) (c) e longo prazo (MLP) (d) e citocina pró-inflamatória IL-1 β e o índice de reconhecimento de objetos da memória de curto (MCP) (e). Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Correlação de Pearson. Grupos: CON ($n = \leq 8$) e D-GAL ($n = \leq 8$).



Fonte: Próprio autor

APÊNDICE E - Desempenho de força muscular máxima e aeróbico no período de administração de D-galactose, antes da intervenção com treinamento físico e/ou suplementação com flavonóis do cacau

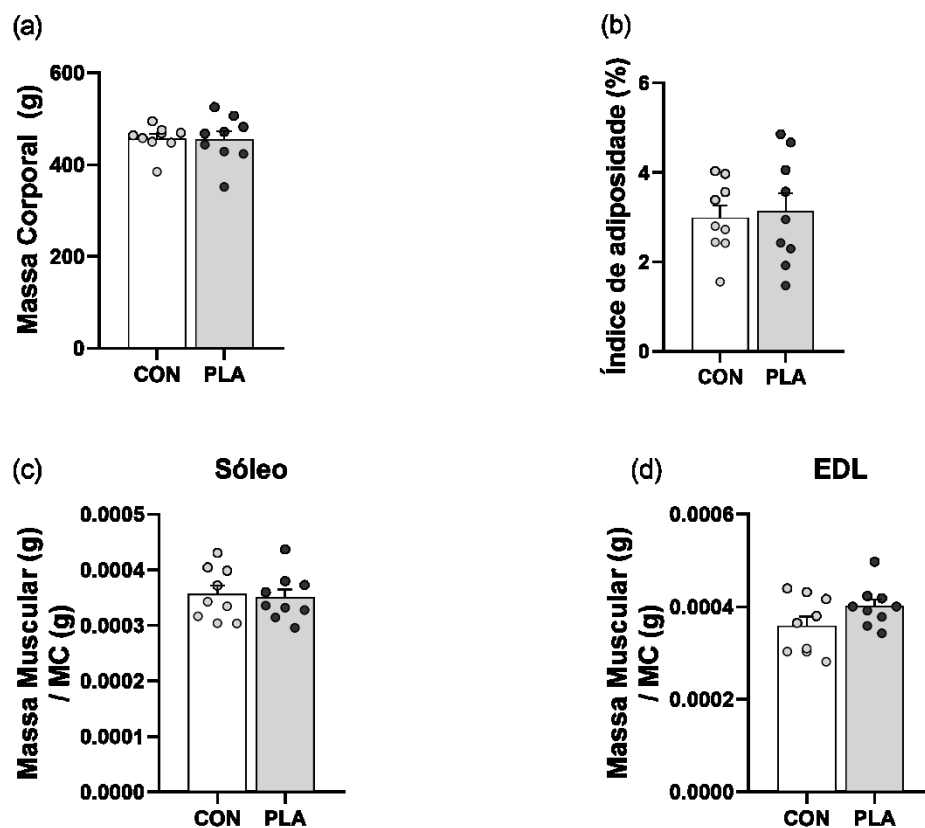
Figura 28 - Variáveis de desempenho físico no período de D-galactose antes da intervenção com treinamento físico e/ou suplementação com flavonóis do cacau. Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Anova one way de medidas repetidas seguido de post hoc de Tukey. ### diferença significativa para o período pré ($p < 0,0001$); &&& diferença significativa para a 4ª Semana ($p < 0,0001$); && diferença significativa para a 4ª Semana ($p = 0,0001$); ## diferença significativa para o período pré ($p = 0,0060$) Grupo: D-GAL (n=45).



Fonte: Próprio autor

APÊNDICE F - Comparação das variáveis de massa corporal, índice de adiposidade e massa dos músculos sóleo e EDL após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo

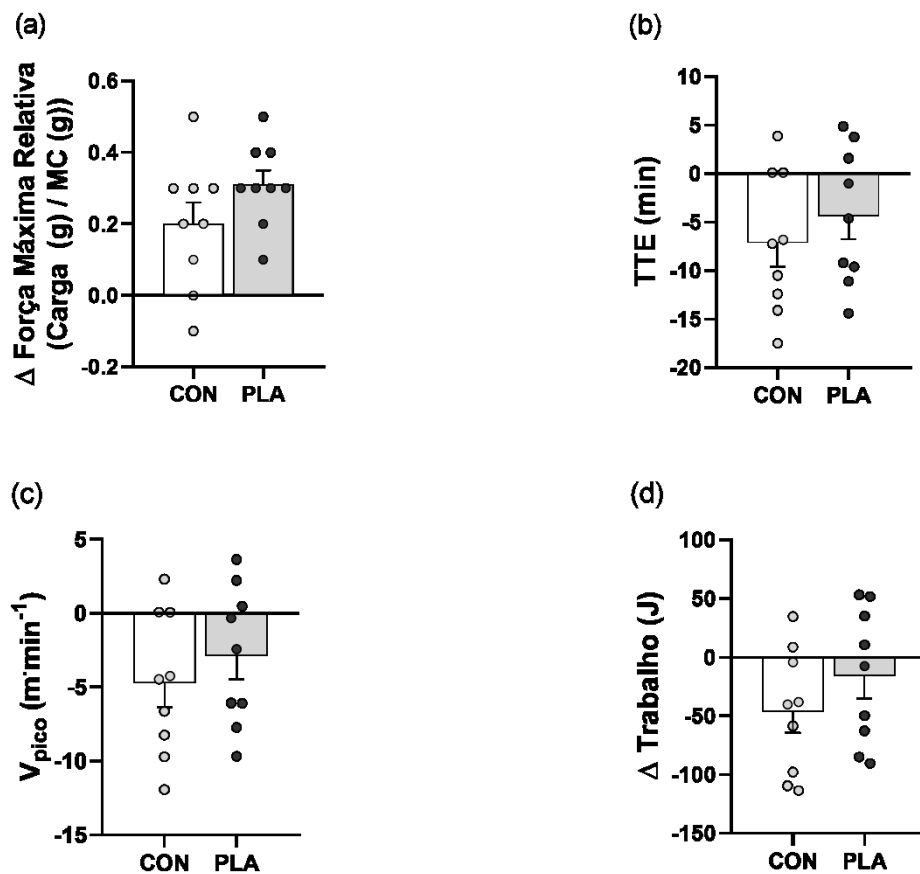
Figura 29 - Massa corporal total (a), índice de adiposidade (b), massa muscular do músculo sóleo (c) e edl (d) após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA). Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Teste T de Student. CON = Controle; PLA = Placebo. Grupos: REP.CON (n=9) e REP. PLA (n=9).



Fonte: Próprio autor

APÊNDICE G - Comparação das variáveis de desempenho físico de força máxima e aeróbico após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo

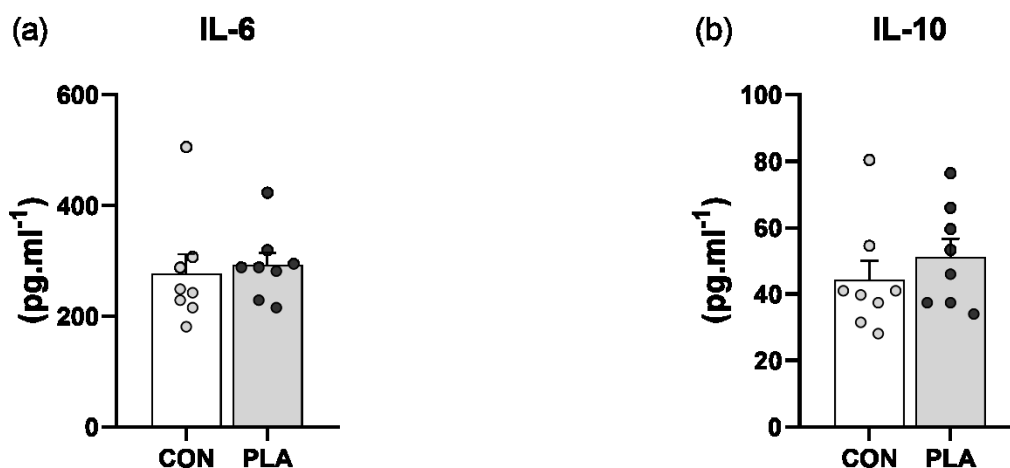
Figura 30 - Delta (Δ) da força relativa pela massa corporal (a), do tempo total de exercício (b), da velocidade pico (c) e do trabalho realizado (d) após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA). Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Teste T de Student. CON = Controle; PLA = Placebo. Grupos: REP.CON (n=9) e REP. PLA (n=9).



Fonte: Próprio autor

APÊNDICE H - Citocinas de ação pró-inflamatória e anti-inflamatória no músculo sóleo após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo

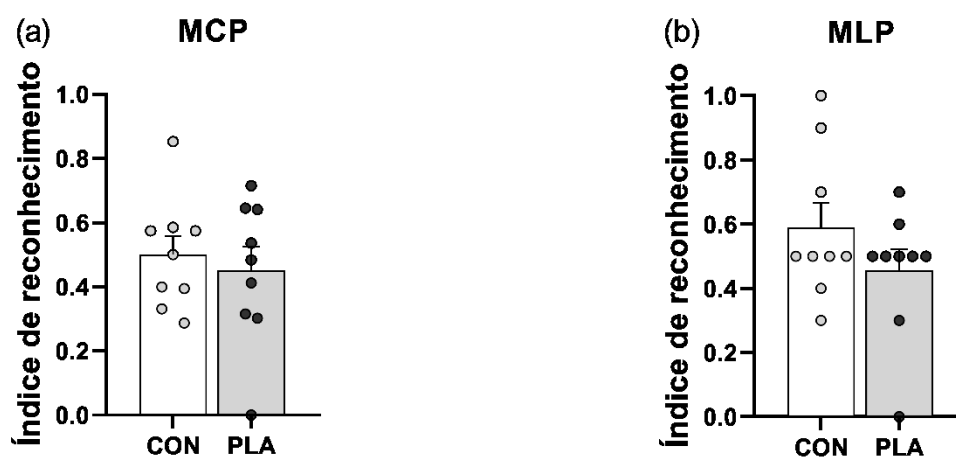
Figura 31 - Citocinas de ação pró (a) e anti-inflamatória (b) no músculo sóleo após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA). Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Teste T de Student. CON = Controle; PLA = Placebo. Grupos: REP.CON (n=8) e REP. PLA (n=8).



Fonte: Próprio autor

APÊNDICE I - Memória de reconhecimento de objetos após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo

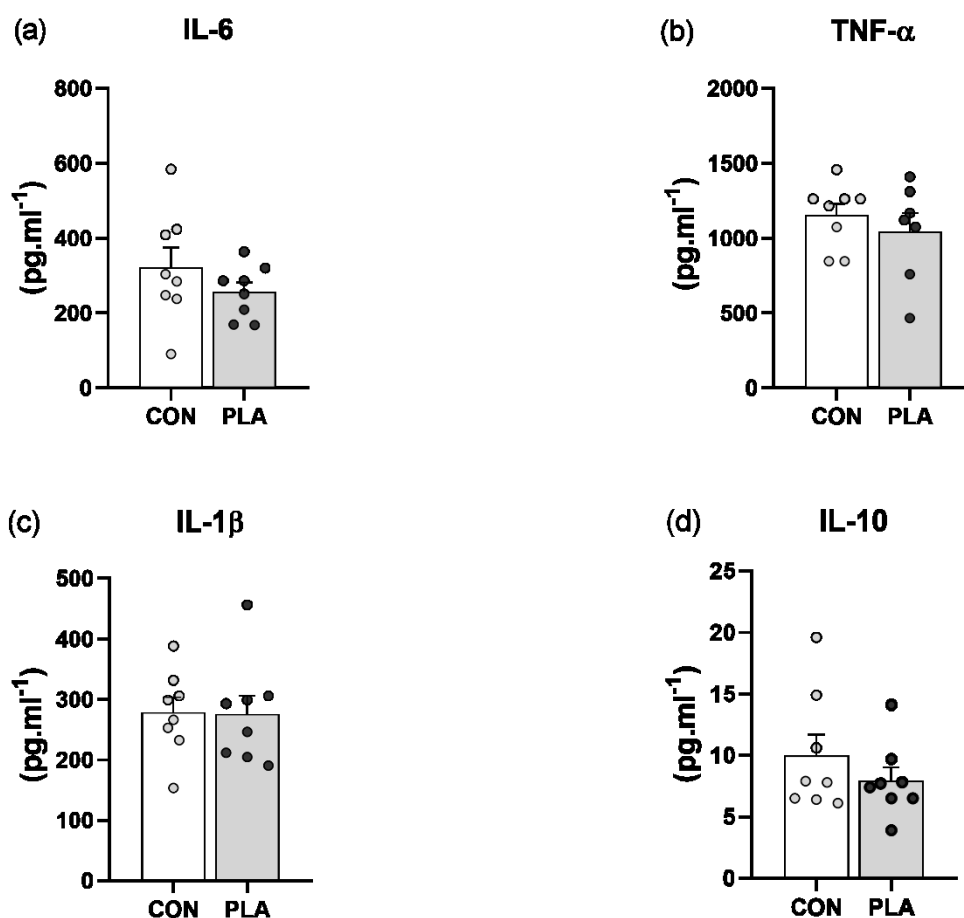
Figura 32 - Índice de reconhecimento de objetos da memória de curto prazo (a) e da memória de longo prazo (b) após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA). Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Teste T de Student. CON = Controle; PLA = Placebo. Grupos: REP.CON (n=9) e REP. PLA (n=9).



Fonte: Próprio autor

**APÊNDICE J - Citocinas de ação pró-inflamatória e anti-inflamatória no
hipocampo após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo**

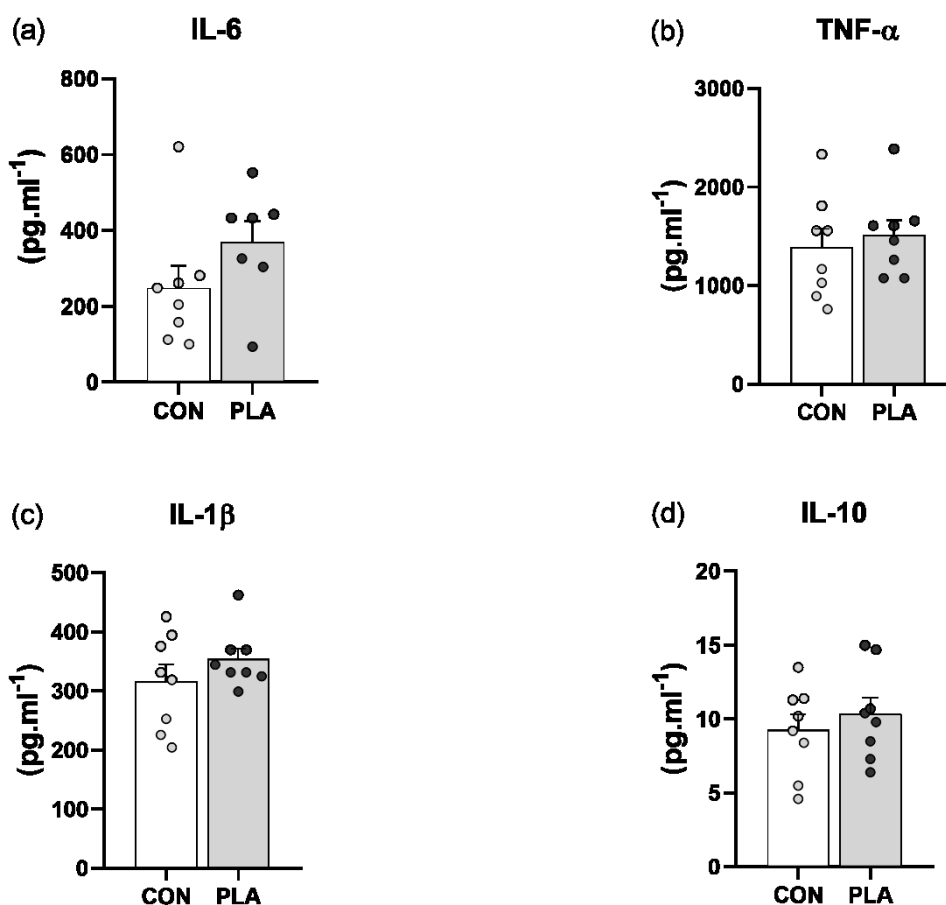
Figura 33 - Citocinas de ação pró-inflamatória (a,b,c) e anti-inflamatória (d) no após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA). Dados estão expressos em média $\pm$ EPM Análise: Teste T de Student. CON = Controle; PLA = Placebo. Grupos: REP.CON (n=8) e REP. PLA (n=8).



Fonte: Próprio autor

APÊNDICE L - Citocinas de ação pró-inflamatória e anti-inflamatória no córtex frontal após oito semanas de repouso e/ou repouso placebo

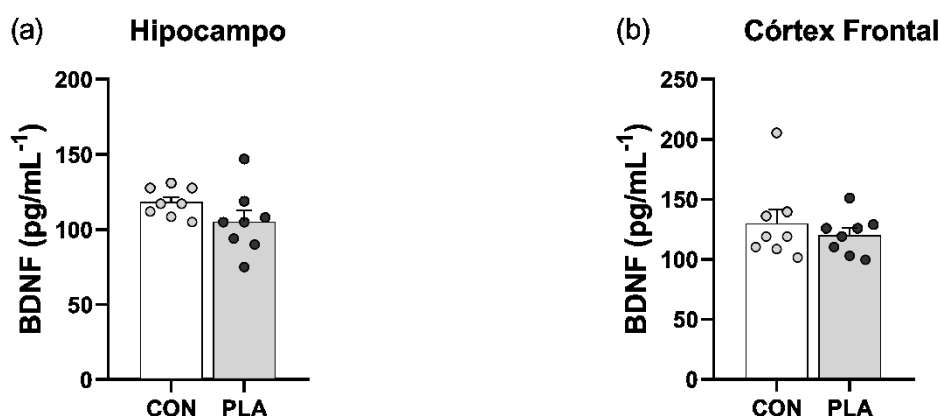
Figura 34 - Citocinas de ação pró (a,b,c) e anti-inflamatória (d) no córtex frontal após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA). Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Teste T de Student. CON = Controle; PLA = Placebo. Grupos: REP.CON (n=8) e REP. PLA (n = $\leq$ 8).



Fonte: Próprio autor

**APÊNDICE M - Concentração de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)
no hipocampo e no córtex frontal após oito semanas de repouso e/ou
repouso placebo**

Figura 35 - Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no hipocampo (a), e no córtex frontal (b) após oito semanas em repouso e/ou repouso com placebo do cacau (PLA). Dados estão expressos em média $\pm$ EPM. Análise: Teste T de Student. CON = Controle; PLA = Placebo. Grupos: REP.CON (n=8) e REP. PLA (n=8).



Fonte: Próprio autor

APÊNDICE N – ARTIGO: AGING-RELATED CHANGES INDUCED BY D-GALACTOSE INJECTION: IMPACT ON PHYSICAL PERFORMANCE, MEMORY FUNCTION, INFLAMMATORY RESPONSE, AND OXIDATIVE STRESS IN RAT MODELS

LEITE, D. M. M.¹, SILVA, M. A.¹, PIZZOL, G. G.¹, MELO, B. P.¹, LEOCADIO, P. C. L.², LEITE, J. I. A.², SOARES, D. D.¹.

1- Exercise Physiology Laboratory, School of Physical Education, Physiotherapy and Occupational Therapy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), Brazil.

2- Laboratory of Atherosclerosis and Nutritional Biochemistry, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), Brazil.

Corresponding Author:

Prof^a. Phd. Danusa Dias Soares

Federal University of Minas Gerais

Departament of Physical Education

Exercise Physiology Laboratory

Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 Campus-Pampulha, Belo Horizonte, Brazil.

Phone: +55 (31) 3409-2350

E-mail: danusa56@gmail.com

ABSTRACT

INTRODUCTION: The number of elderly individuals has considerably increased in recent decades, and in an attempt to understand the physiological mechanisms related to aging, experimental models are developed in laboratories using mainly rodents. It has been described in the literature that the administration of D-galactose, a reducing sugar, in high concentrations, can accelerate the aging process in animals. Although the deleterious impacts of aging are well known, the impact of D-galactose on physical performance and memory remains unclear. **OBJECTIVES:** To analyze the effects of the administration of 150 mg/kg/day of D-galactose for eight weeks on physical performance, memory, inflammatory profile, and markers of oxidative stress. **METHODS:** Thirty male Wistar rats (250 ± 10 g) were allocated into two groups (CON, $n = 15$) and (D GAL, $n = 15$). The aging group (D-GAL) underwent an eight-week aging induction protocol by intraperitoneal administration of D-galactose diluted in 0.9% saline solution, while the other group (CON) was administered only saline solution. Both groups underwent the Novel Object Recognition Test for memory evaluation (pre and post-aging), maximal strength tests on a vertical ladder and incremental treadmill exercise performed at pre, four weeks, and post-aging by D-GAL for muscle strength assessment, peak VO₂, total exercise time, peak speed, and work capacity (J), respectively. Samples of skeletal muscle, soleus, and EDL, as well as brain, hippocampus, and prefrontal cortex, were used for analysis of inflammatory parameters and oxidative stress by spectrophotometry. **RESULTS:** D-GAL promoted a decrease in aerobic performance, including peak VO₂ (53.58 ± 1.81 vs. 48.46 ± 1.56 ml/kg/min; $p = 0.044$), TTE (52.62 ± 2.57 vs. 44.24 ± 2.31 min; $p = 0.023$), and total work (327.61 ± 23.86 vs. 248.32 ± 15.41 Joules; $p = 0.011$) after 4 weeks, and also total work (320.86 ± 23.86 vs. 268.32 ± 15.24 Joules; $p = 0.041$) after 8 weeks of D-GAL administration. Additionally, D-GAL rats showed increased lipid hydroperoxides in the EDL ($p = 0.01$) and a significant inverse correlation between hydroperoxide levels and total exercise time ($r = -0.594$; $p = 0.049$; $r^2 = 0.352$), as well as a significant positive correlation between IL-10 concentrations and peak VO₂ ($r = 0.700$; $p = 0.011$; $r^2 = 0.491$). In the soleus muscle, IL-10 concentrations were reduced ($p = 0.04$), and there was an increase in the IL-1 β / IL-10 ratio ($p = 0.010$), demonstrating a pro-inflammatory milieu in this muscle. The discrimination index in long-term memory (LTM) was decreased by D-GAL ($p < 0.001$), showing a decline in long-term memory. Compared to the CON group, D-GAL administration increased TBARS levels ($p = 0.020$) and hydroperoxides ($p = 0.040$) in the hippocampus after 8 weeks of intervention. Associated with oxidative stress, a significant inverse correlation was found between TBARS levels in the hippocampus and the object discrimination index in LTM ($r = -0.773$; $p < 0.001$; $r^2 = 0.597$), demonstrating the influence of oxidative stress on memory decline. The results also demonstrated that D-GAL increased hydroperoxide levels ($p = 0.049$) and decreased IL-10 in the prefrontal cortex ($p = 0.044$). Additionally, there was an increase in the IL-1 β / IL-10 ratio compared to the CON group ($p < 0.001$) and a significant inverse correlation between IL-1 β concentration in the prefrontal cortex and the object recognition index in LTM ($r = -0.812$; $p < 0.001$; $r^2 = 0.660$). **CONCLUSION:** Aging induced by D-Gal demonstrated efficacy in promoting a reduction in aerobic physical performance and memory, associated with oxidative damage in the EDL muscle, as well as in the hippocampus and prefrontal cortex. Additionally, it was found that its administration caused inflammation in the soleus muscle and neuroinflammation in the hippocampus and prefrontal cortex of rats.

Keywords: Aging. D-Galactose. Cytokines. Oxidative stress.

INTRODUCTION

The aging process entails effects on the human body, many of which are irreversible, causing damage to molecules, cells, and tissues, especially in the brain, leading to neurodegeneration of the central nervous system and progressive impairment of functionality, resulting in the loss of muscular strength, aerobic capacity, and cognitive function (GARATACHEA et al., 2015; ISAAC et al., 2021).

Scientific evidence has shown that aging can lead to increased expression of inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1B, and TNF in both the brain (BELLETINI-SANTOS et al., 2022) and skeletal muscle (YANAR et al., 2019), caused by a chronic inflammatory process known as "inflammaging" (chronic inflammation related to aging) (FRANCHESCHI et al., 2018). It is believed that aging-related inflammation results from a combination of factors, including cellular senescence, dysregulation of the immune system, and accumulation of damage over time. This chronic inflammation can disrupt tissue homeostasis, impair cellular function, and promote the progression of age-related conditions such as cardiovascular diseases, neurodegeneration, and metabolic disorders (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013; FRANCHESCHI et al., 2018).

During the aging process, there is a noticeable increase in oxidative stress, characterized by an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the capacity of antioxidant defense mechanisms to neutralize them (CUI et al., 2006; AYALA et al., 2014). This phenomenon arises due to various factors, including cellular metabolism, environmental stressors, and lifestyle choices, leading to cumulative damage to cellular components such as lipids, proteins, and nucleic acids. The accumulation of oxidative damage over time contributes to the pathogenesis of age-related diseases, including neurodegenerative disorders, musculoskeletal issues, cardiovascular diseases, and cancer (LIGUORI et al., 2018).

Although research on aging has advanced considerably in recent years, the etiology of this process is still not fully understood (LÓPEZ-OTÍN et al., 2013). In an attempt to gain a deeper understanding (at cellular and molecular levels) of the physiological mechanisms related to aging, aging models have been developed in laboratories, primarily using rodents (SADIGH-ETEGHAD et al., 2017; AZMAN,

2019). In this regard, animal models of senescence using D-galactose (D-GAL) are described in the literature (XU et al., 1985; SADIGH-ETEGHAD et al., 2017; AZMAN et al., 2019; LIN et al., 2020). Chronic administration of D-GAL in rodents can lead to memory impairments dependent on the hippocampus, with decreased concentrations of BDNF (CHEN et al., 2016), increased levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (BUDNI et al., 2016), and increased expression of JNK (c-Jun N-terminal kinase) proteins, belonging to the MAPK (mitogen-activated protein kinase) family, and nuclear factor KB (NF-KB), which play an important role in the release of inflammatory cytokines, including IL-6, IL1 β , and TNF- α (LIU et al., 2017), contributing to neuroinflammation and memory impairment (DUAN et al., 2017; NAN et al., 2019). In contrast, on the other hand, studies have shown that D-GAL did not have deleterious effects on object recognition memory and neurogenesis at doses of 150 and 300 mg/kg/day for 8 weeks (TIKHONOVA et al., 2014; CARDOSO et al., 2015).

Additionally, to the potential detrimental effects of chronic administration of D-galactose (D-GAL) on memory, studies in rodents have shown that exercise capacity decreases in some cases (BELVIRANLI M, OKUDAN N, 2019) or remains unchanged in others (LEE et al., 2019; ZHANG et al., 2023) with D-GAL administration. However, none of the cited studies evaluated the maximum oxidative capacity of these animals.

Although research indicates that exercise performance is either decreased or remains unchanged, the assessment of maximum aerobic physical performance in animals subjected to aging by D-galactose (D-GAL) is scarce. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effects of D-GAL on physical performance, memory, inflammatory profile, and oxidative stress in rats experimentally induced to aging.

MATERIAL AND METHODS

Animals and Ethics Care

Thirty male Wistar rats (250 g) were used in the experiments. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee Care and Use of Laboratory Animals of the Federal University of Minas Gerais (CEUA - UFMG) and were conducted following the Brazilian National Council for the Control of

Animal Experimentation (CONCEA) (protocols nº 161/2020). The rats were housed in collective cages (four rats in each cage) under controlled temperature (24°C) and light conditions (12/12 hours).

Experimental design

The rats were habituated to the laboratory environment for seven days and weighed by body mass on a digital scale (FILIZOLA®), randomized and stratified by body mass into two experimental groups: Control (CON; n = 15) and D-galactose (D-GAL; n = 15). After balancing, both groups underwent the Novel Object Recognition Test (NOR) to assess short-term memory (STM) and long-term memory (LTM) for three consecutive days (BEVINS; BESHEER 2006). After the last day of the task, the groups were familiarized with climbing a vertical ladder for three days and with running on a treadmill for five consecutive days. After the last day of familiarization with the stairs and treadmill, the animals were subjected to the maximum strength test on stairs (MWC) (NOVAES GOMES *et al.*, 2014; DINIZ and MAGALHÃES *et al.*, 2022) and the incremental running test (PRÍMOLA-GOMES *et al.*, 2009) to assess their physical performance in terms of maximum strength and aerobic capacity. The D-GAL group was then subjected to an eight-week aging induction protocol through the administration of intraperitoneal D- galactose, while the CON group received only 0.9% saline solution (LIN *et al.*, 2020). At the end of the fourth week of the aging protocol, the animals were again subjected to strength and incremental tests to assess physical performance over the 28 days of intervention with D-galactose. At the end of the ageing protocol, both groups underwent the RON test again, to assess STM and LTM memory and to assess strength and aerobic physical performance to investigate the possible deleterious effects of D- galactose and confirm the clinical picture of brain ageing. The animals were euthanized by decapitation 48 hours after the end of the experimental session, the tissues removed for biochemical analysis later. All procedures were carried out between 07:00 and 17:00 PM (Fig. 1).

There was a sample loss in the D-GAL group, totaling (n = 14). For the memory data, one animal from the D- GAL group and two animals from the CON group did not explore the objects in the training phase and were excluded from the analysis, totaling (n = 13) for each of the groups. For Vo2peak there was a sample loss in the D-GAL group (n = 13). For the analysis of relative muscle strength results,

TBARS, lipid hydroperoxides, and cytokines, ($n \leq 8$) were used as indicated in the graphs.

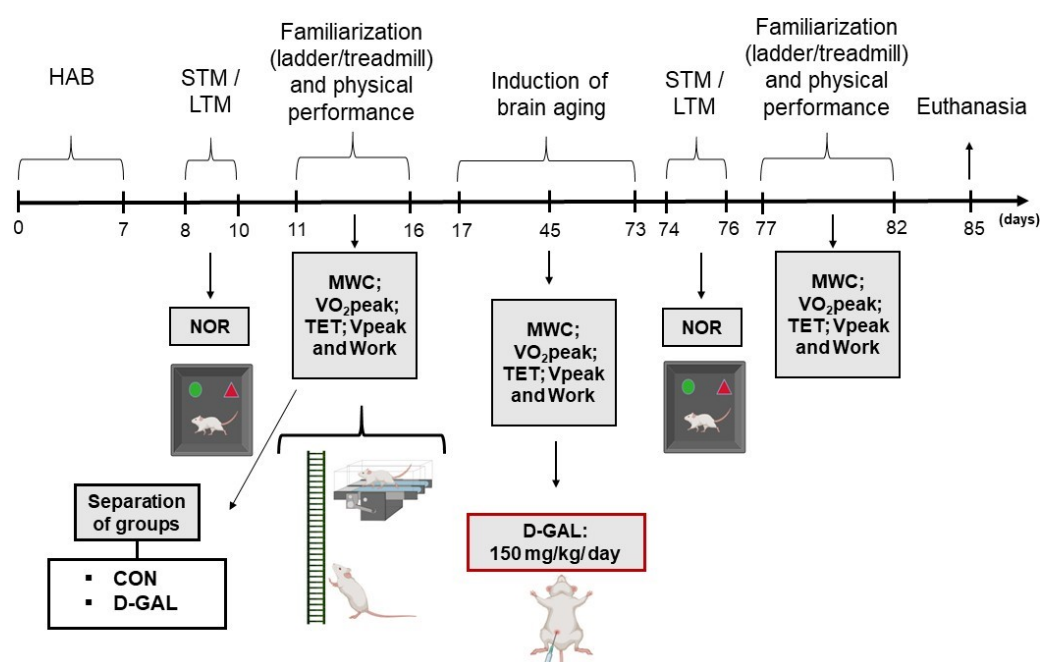


Figure. 1. Experimental design.

HAB: Habituation; CON: Control group; D-GAL: D Galactose group; NOR: Novel object recognition; STM: Short-term memory; LTM: Long-term memory; MWC: Maximal weight carried test; Vo peak: Volume peak of oxygen; TET: Total exercise time; Vpeak: Peak speed; Work: Work in joule; Mg: Milligram; Kg: Kilogram.

Inducing brain ageing

The clinical picture of aging was established through the administration of 150 mg/kg/day of D-galactose powder (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA, G0750), diluted in 0.9% saline solution ($100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), applied via intraperitoneal injection for 8 weeks (LIN *et al.*, 2020).

Novel Object Recognition (NOR)

The NOR task is a consolidated test in the literature to assess short and long-term memory (BEVINS AND BESHEER, 2006; CRUNFLI *et al.*, 2019). It was performed in four stages for three consecutive days. On the first day, familiarization with the arena was performed and consisted of positioning the rats in the center of a square box (70 cm x 70 cm x 40 cm) for free five-minute exploration.

On the second day, during the training phase, two identical objects (A) were placed parallel to each other at the ends of the box for free exploration for 10

minutes. Sixty minutes after training, short-term memory (STM) was assessed for 5 minutes, with a new object (B) replacing a familiar object (A).

On the third day, 24 hours later, long-term memory (LTM) was assessed using a new object (C) in place of object (B) for 5 minutes (DINIZ and MAGALHÃES *et al.*, 2022). At each assessment, the arena and objects were cleaned with 70% alcohol to avoid olfactory cues.

Any Maze software was used to analyze the results (ANY Maze Video Tracking System 7.16; STOELTING CO. ©, 2022). The discrimination index was calculated, which consists of the time taken to explore the new object (TN) divided by the sum of the exploration of the new object and the familiar object (TN + TF) (BEVINS; BESHEER, 2006, ROJAS *et al.* 2013).

Vertical ladder familiarization

The rats were familiarized with a vertical ladder inclined at 80° (110 cm X 18 cm, with 2 cm between the steps). The vertical ladder familiarization protocol consisted of three trials per day for three days. Initially, the rats were kept in the housing chamber for 60 seconds and then placed on the ladder at 35 cm, 55 cm and 110 cm from the top. Between each trial the animals remained in the housing chamber for 60 seconds (CASSILHAS *et al.*, 2012; CASSILHAS *et al.*, 2013).

Maximal weight carried test (MWC)

The maximum load test consisted of the animal initially climbing with a load corresponding to 75% of its body mass attached to the proximal part of the tail, into 50 mL Falcon tubes with fishing weights attached to a plastic-coated steel cable secured by a rubber band (Scotch 3 M). For each successful climb, the animal remained in the ladder housing for 60 seconds and a weight of 30 grams was added. Failure was determined when the animal was unable to continue climbing even after 3 successive gentle stimuli on the tail (GOMES *et al.*, 2014; DINIZ e MAGALHÃES *et al.*, 2022). The results were analyzed using the relative maximum load according to the following equation: MWC/BM , where MWC is the maximum load obtained in the strength test and MC, the animal's body mass in kilograms.

Treadmill running familiarization

The familiarization protocol for running on a treadmill (Panlab/Havard Apparatus, Cornella Spain) was carried out over five consecutive days for 5 minutes a day at an incremental speed adjusted every minute (10, 10, 11, 13 and 15 m.min⁻¹) with a 5% incline and an electrical stimulus set at 0.28 mA (PRÍMOLA-GOMES *et al.*, 2009).

Incremental running test

The incremental treadmill running test (Panlab/Harvard Apparatus) was started at a speed of 10 m.min⁻¹, with progressive increments of 1 m.min⁻¹ every 3 minutes. The incline and electrical stimulation were similar to the familiarization protocol. The test was stopped when the animal remained on the electrical stimulation grid for 10 seconds. Peak oxygen consumption (Vo₂peak) was analyzed using open-flow indirect calorimetry (Gas Analyzer Panlab/Havard Apparatus, Cornella Spain). Aerobic performance was assessed by VO₂peak, total exercise time (TET), peak velocity (Vpeak) and total work (J). The highest VO₂peak and Vpeak values obtained during the incremental test were taken into account when analyzing the results. Total work was calculated using the equation: $W = m \times g \times s \times \sin\theta \times t$, where MC is the animal's body mass in kilograms; g: The acceleration of gravity (9.8 m.s⁻²); v: The speed of the treadmill in meters per minute; sin θ : The angle of inclination of the treadmill (5°) and t: The time spent on each stage in minutes (SOARES *et al.*, 2019; MELO *et al.*, 2022).

Euthanasia and Adiposity index

The rats were euthanized by guillotine decapitation, without prior sedation, 48 hours after the last incremental test session. The hippocampus, prefrontal cortex, soleus muscle and EDL tissues were removed and stored at -80 °C for later analysis. The retroperitoneal (TAR), mesenteric (TAM) and epididymal (TAE) adipose tissues were removed completely and weighed on a scale (SHIMADZU® Model BL320H, precision 0.001g) to determine the adiposity index (IA%), using the following equation: Adiposity index = (TAR + TAM + TAE) / MC x 100, where MC = Total body mass.

Biochemical analyses

Oxidative stress

Approximately 50mg was taken from each organ to assess oxidative stress parameters. The fragments were homogenized with ice-cold 1x PBS and centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes. The supernatant was separated for analysis.

Evaluation of lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Thiobarbituric acid-reactive metabolites were measured by adding a solution containing trichloroacetic acid (TCA 15%), thiobarbituric acid (TBA 0.0375%) and hydrochloric acid (HCl 0.25 N) to the organ supernatants. The samples were kept in a boiling water bath for 15 minutes and then cooled. After adding butyl alcohol, the tubes were shaken vigorously. The samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. 200µL of the supernatant was added to the 96-well plate. The absorbance was measured spectrophotometrically at a wavelength of 535nm, and the results were normalized by the concentration of protein in the hippocampus, prefrontal cortex and soleus and Edl muscles (LOWRY *et al.*, 1951).

Evaluation of hydroperoxide concentration

This test was carried out using part of the solution prepared by dissolving xylenol orange and ammoniacal ferrous sulphate in H₂SO₄ diluted in methanol solution containing BHT (butylated hydroxytoluene). For the dosages, the organ supernatants (20µL each) were added to 180µL of the aforementioned solution, directly into the microplate, in triplicate. The blank was achieved by using phosphate buffer instead of the supernatant. The samples were then kept at room temperature for 30 minutes and the absorbance was measured spectrophotometrically at a wavelength of 560nm. The concentration of hydroperoxides was estimated by the extinction coefficient of hydroperoxides, $4.3 \times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$, and by the extinction coefficient of the bluish- purple chromophore produced by xylenol orange when it binds to ferric ions, $1.5 \times 10^{-4} \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. The quantification of hydroperoxides in the sample was achieved without TPP and the result was normalized by the protein

concentration of each fragment (LOWRY *et al.*, 1951).

Protein dosage

The protein concentration in the organ supernatant was measured according to Lowry *et al.* (1951). To do this, 250µL of diluted sample (1:50) was added to 250µL of solution A (one-part copper sulphate, one-part sodium tartrate and 100 parts sodium carbonate) and 25µL of diluted Folin-Ciocalteu reagent (1:2). The samples were then vortexed and incubated at room temperature for 30 minutes. The samples (200µL) were then added to the 96-well plate and the absorbance was measured spectrophotometrically at a wavelength of 660nm. The results were expressed in mg/mL after obtaining the formula from the standard curve made with albumin.

Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines

The concentrations of interleukin 6 (IL-6), interleukin 10 (IL-10), interleukin 1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor (TNF- α) were assessed in the hippocampus, prefrontal cortex, soleus muscle and EDL by means of ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA; DuoSet kits DY506, DY522, DY501, and DY510, respectively). Manufacturer's recommendations were followed. These areas were chosen because of their relationship with learning and memory (hippocampus), attention and decision-making (prefrontal cortex) and muscles related to aerobic and strength performance (soleus and EDL).

Statistical analyses

The normality of the data and the homoscedasticity of the residuals were assessed using the Shapiro-Wilk and Levene tests respectively. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. Aerobic performance, maximal muscle strength, and short- and long-term memory variables were compared using mixed two-way ANOVA, considering the factors groups (CON vs. D GAL) and time (pre vs. 4th week vs. 8th week). When significant differences were found, Bonferroni post hoc and/or Student's t-test were performed, considering the mean coefficient of variation of the two groups (CON vs. D GAL) at the three experimental time points (SAMPALIO, 2007). To compare body composition values, cytokine concentrations, and markers of oxidative stress between groups (CON vs. D GAL), Student's t-test was used.

Pearson's test was used to investigate correlations between oxidative stress concentrations, cytokines, and their association with aerobic performance and short- and long-term memory. All analyses were performed using R software (version 4.2.2, USA) with Rstudio interface (version 2023.06 + 421). The significance level adopted was 5% ($p \leq 0.05$).

RESULTS

Body composition and adiposity index

Body weight increased ($F_{2,54} = 445.55$; $p < 0.001$) similarly in CON and D-GAL groups in the 4- and after 8 weeks of intervention (Figure 2a). When compared to the CON group, D-GAL administration did not alter the adiposity index (4.96 ± 0.37 vs. 5.03 ± 0.27 %; $t_{27} = 0.15$; $p = 0.880$; Figure 2b), soleus muscle mass (0.14 ± 0.01 vs. 0.16 ± 0.01 g; $t_{14} = 1.063$; $p = 0.305$; Figure 2c), and either EDL muscle mass (0.20 ± 0.01 vs. 0.21 ± 0.01 g; $t_{14} = 0.285$; $p = 0.779$, Figure 2d).

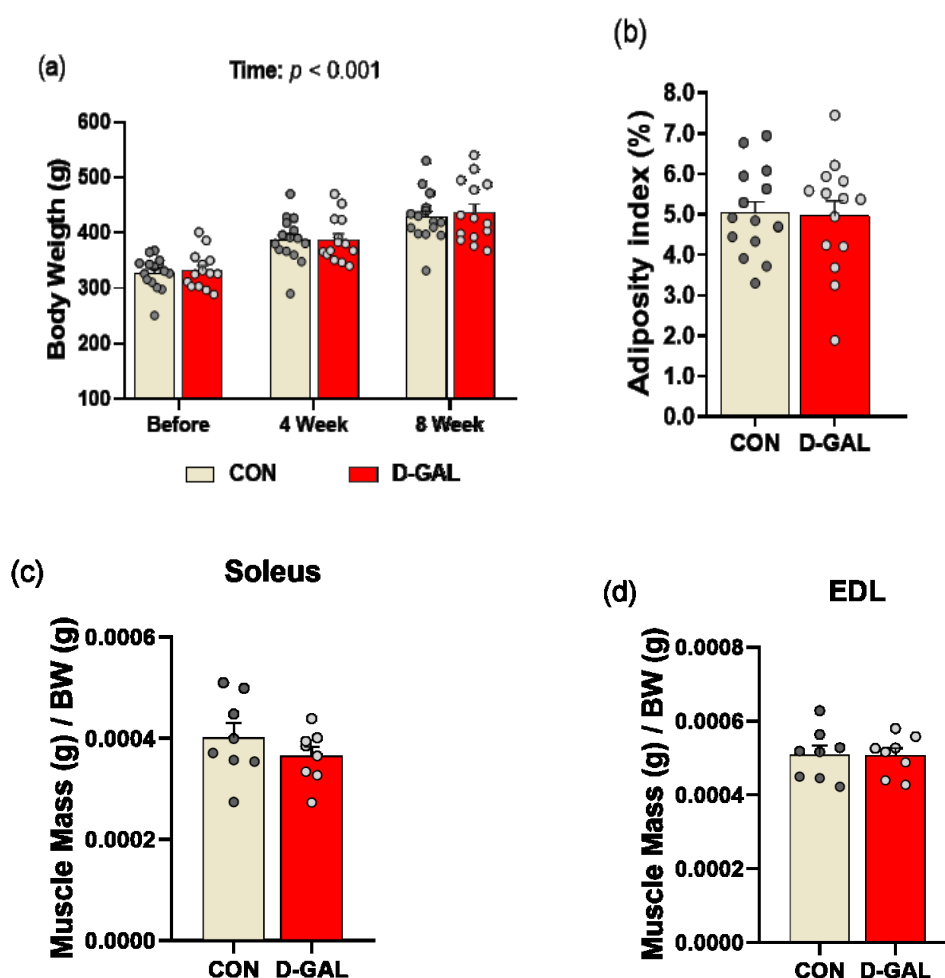


Figure. 2. Body weight, adiposity index, and muscle mass before, 4, and after 8 weeks of intervention.

a) Body weight; b) Adiposity index, c) Muscle mass (Soleus), and d) Muscle mass (EDL). Mean $\pm$ EPM. Mixed Anova analysis for body weight. Student's Test for adiposity index and muscle mass. CON (n = 15); D-GAL (n = 14) for body weight and adiposity index; CON (n = 8); D-GAL (n = 8) for muscle mass (Soleus and EDL).

Physical Performance

The results of physical performance are expressed in Figure 3a-e. Relative muscle strength increased ($F_{2,28} = 5.70$; $p = 0.008$) similarly in CON and D-GAL groups in the 4- and after 8 weeks of intervention (Figure 3a).

The aging D-GAL-induced administration reduced the aerobic capacity and attenuated the total work after 8 weeks of the intervention. Compared to baseline, D-GAL administration reduced 11.6% the VO_{2peak} in 4- ($p = 0.008$), and 12.2% after 8 weeks ($p = 0.003$; Figure 3b). Moreover, the total exercise time was also reduced in aging rats in both moments (50.49 ± 3.54 vs 44.24 ± 2.31 min; $p = 0.039$, and 50.49 ± 3.54 vs. 43.94 ± 2.30 min; $p = 0.024$; Figure 3c), respectively. An ANOVA-mixed time effect was found in the V_{peak} ($F_{2,54} = 3.453$; $p = 0.048$; Figure 3d) and total work ($F_{2,54} = 4.542$; $p = 0.015$; Figure 3e).

When compared to the CON group, the aging rats showed the lowest values of VO_{2peak} (53.58 ± 1.81 vs. 48.46 ± 1.56 ml·kg⁻¹·min⁻¹; $p = 0.044$; Figure 3b), TET (52.62 ± 2.57 vs. 44.24 ± 2.31 min; $p = 0.023$; Figure 3c) and, total work (327.61 ± 23.86 vs 248.32 ± 15.41 Joules; $p = 0.011$; Figure 3e) after 4-week, and also total work (320.86 ± 23.86 vs 268.32 ± 15.24 Joules; $p = 0.041$; Figure 3e) after 8-week of D-GAL administration. Moreover, the aging D-GAL-induced administration attenuated the total work of the aerobic exercise. The CON group increased 26.8% ($p = 0.005$) of the total work in 4-, and 24.2% ($p = 0.005$) after 8 weeks, however, this response was not observed in aging rats (Figure 3e).

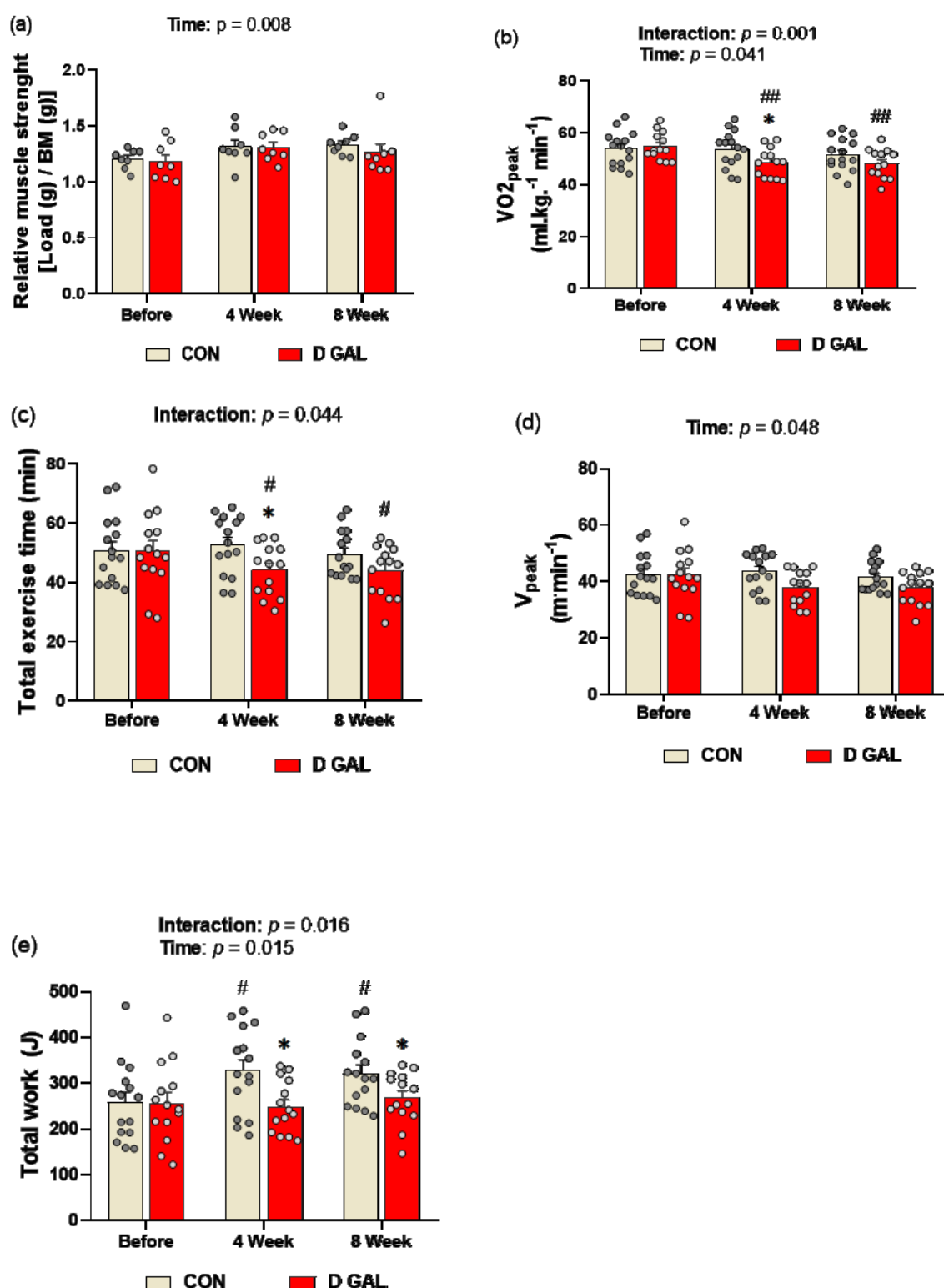


Figure 3. Relative muscle strength, VO_{2peak} , Total exercise time, V_{peak} and Total work (J) during the 4 and after 8 weeks of D-GAL.

a) Relative muscle strength; b) VO_{2peak} ; c) Total exercise time (TET); d) V_{peak} ; e) Total work (J). Mean $\pm$ SEM. Mixed Anova followed by Student's T test for V_{peak} , TET and Work (J) and Bonferroni post-hoc analysis for VO_{2peak} and Relative muscle strength. * Significant difference vs CON ($p < 0.05$). # Significant difference vs. before

($p < 0.05$); CON ($n = 15$); D-GAL ($n = \leq 14$) and CON ($n = 8$); D-GAL ($n = 8$) for Relative muscle strength.

Skeletal Muscle Analysis

The effects of aging on oxidative stress were observed in the skeletal muscle. D-GAL administration increased significantly ($t_{12} = 2.949$; $p = 0.01$) hydroperoxide levels in the EDL muscle after 8 weeks of administration (Figure 4a). A significant, and inverse correlation ($r = -0.594$; $p = 0.049$; $r^2 = 0.352$; Figure 4f) was observed between hydroperoxide levels and total exercise time, demonstrating the influence of oxidative stress in the skeletal muscle on aerobic capacity. Although no significant differences were observed in cytokines pro- or anti-inflammatory in the EDL muscle (Figure 4b-e), a significant, and positive correlation ($r = 0.700$; $p = 0.011$; $r^2 = 0.491$) was also found between IL-10 concentrations and VO_{2peak} (Figure 4g), demonstrating the role of the anti-inflammatory cytokine on the preservation of the aerobic capacity during aging.

In the soleus muscle, the aging D-GAL-induced administration reduced IL-10 concentrations ($t_{13} = 2.232$; $p = 0.04$; Figure 5d), and increased IL-1 β /IL-10 ratio ($t_{12} = 2.679$; $p = 0.010$; Figure 5e), demonstrating a pro-inflammatory milieu in this skeletal muscle. However, no correlation ($r = 0.239$; $p = 0.389$; $r^2 = 0.057$) was observed between IL-10 and VO_{2peak} . No significant differences were observed in cytokines pro-inflammatory (Figure 5b, c), and either oxidative stress (Figure 5a). Thus, no correlation ($r = 0.075$; $p = 0.788$; $r^2 = 0.005$) was observed between hydroperoxide levels and total exercise time.

Extensor digitorum longus (EDL) analysis

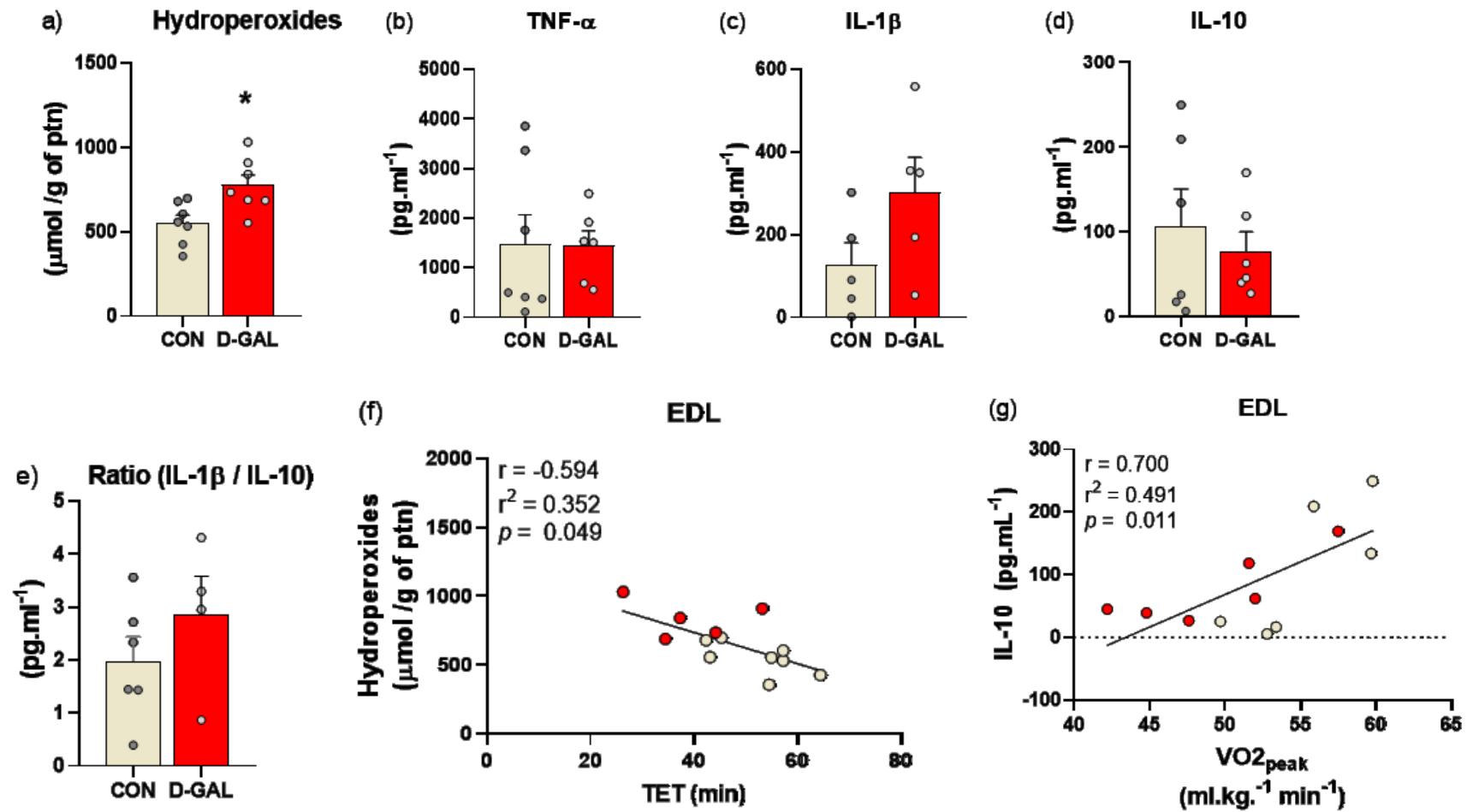


Figure 4. Hydroperoxides, cytokine concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-10 and Pearson's correlation in the EDL muscle after 8 weeks of D-GAL.

a) Hydroperoxides – EDL; b) TNF- α – EDL; c) IL-1 β – EDL; d) IL-10 – EDL; e) Ratio IL-1 β / IL-10 – EDL f) Pearson's correlation (TET / Hydroperoxides) – EDL; g) Pearson's correlation ($VO_{2\text{peak}}$ / IL-10). Mean $\pm$ SEM. Student's T test. * Significant difference vs. CON. Hydroperoxides ($p = 0.01$).

Soleus muscle analysis

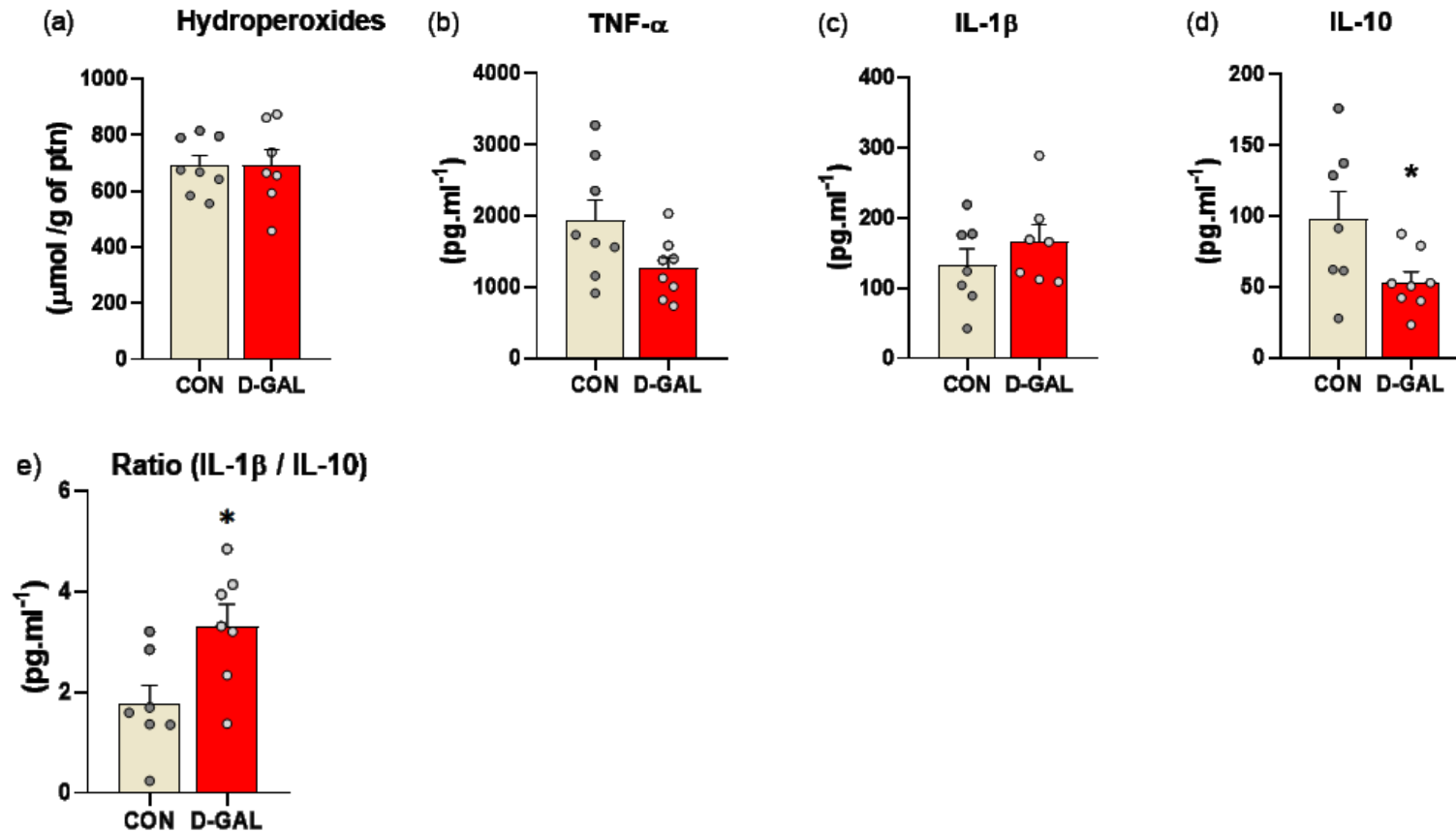


Figure. 5. Hydroperoxides and cytokine concentration of TNF- α , IL-1 β , and IL-10 in the soleus muscle after 8 weeks of D-GAL. a) Hydroperoxides - Soleus; b) TNF- α – Soleus; c) IL-1 β – Soleus; d) IL-10 – Soleus; f) Ratio IL-1 β / IL-10 – Soleus. Mean $\pm$ SEM. Student's T-test. * Significant difference vs. CON. IL-10 ($p < 0.05$) and IL-1 β / IL-10 ratio ($p = 0.01$). CON ($n = \leq 8$); D-GAL ($n = \leq 8$).

Recognition memory

The effects of aging D-GAL-induced administration on recognition memory are expressed in Figures 6a-b. The D-GAL administration promoted cognitive impairment after 8- weeks of the intervention. A mixed ANOVA analysis demonstrated a significant effect of time ($F_{1,24} = 18.554$; $p < 0.001$) and group ($F_{1,27} = 11.077$; $p = 0.002$) in the short-term memory recognition index (STM; Figure 6a). Compared to the baseline, the aging rats reduced ($p < 0.001$; Figure 6b) the recognition index of the long-term memory test (LTM), demonstrating a cognitive decline in long-term memory. Moreover, compared to the CON group, the aging rats showed the lowest values ($p < 0.001$; Figure 6b) on the LTM recognition index after 8- weeks.

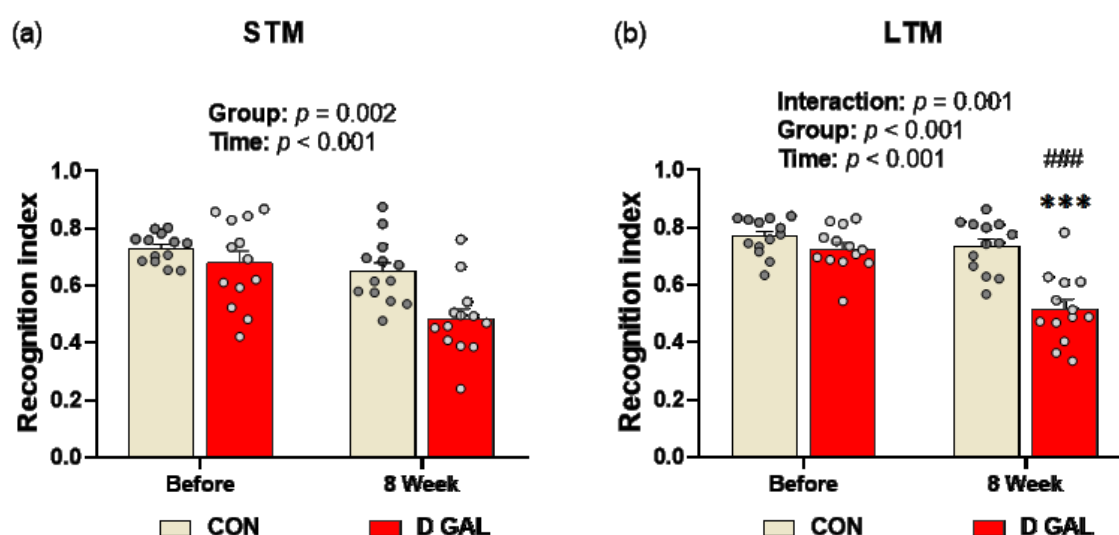


Figure 6. Short and long-term memory before and after 8 weeks of D-GAL.

a) STM - NOR; b) LTM - NOR. Mean $\pm$ SEM. Mixed Anova followed by Bonferroni post-hoc analysis. ***Significant difference vs. CON ($p < 0.001$), ###Significant difference vs. before D-GAL ($p < 0.001$). CON ($n = 13$); D-GAL ($n = 13$)

Hippocampus analysis

The results of hippocampus analysis are expressed in Figures 7a-h. The aging D-GAL-induced increased oxidative stress on the hippocampus and, it was associated with impairment of long-term memory. Compared to the CON group, D-GAL administration increased TBARS ($t_{13} = 3.673$; $p = 0.020$; Figure 7a), and hydroperoxides levels ($t_9 = 2.399$; $p = 0.040$; Figure 7b) on the hippocampus after 8-weeks of the intervention. A significant, and inverse correlation ($r = -0.773$; $p < 0.001$; $r^2 = 0.597$; Figure 7h) was found between TBARS levels and the LTM recognition index, demonstrating the influence of oxidative stress on memory loss. However, no

significant correlation ($r = -0.477$; $p = 0.094$; $r^2 = 0.200$) was found between TBARS levels and the STM recognition index, and hydroperoxides levels in short ($r = -0.576$; $p = 0.063$; $r^2 = 0.332$) or long-term memory ($r = -0.434$; $p = 0.181$; $r^2 = 0.188$).

Compared to the CON group, the D-GAL administration also reduced TNF- α ($t_{14} = 3.262$; $p < 0.011$; Figure 7c), and IL-10 ($t_{14} = 3.005$; $p < 0.001$; Figure 7f) concentrations in the hippocampus after 8- weeks of the intervention. No significant difference was found in the IL-6 ($t_{14} = 1.780$; $p = 0.092$; Figure 7d), IL-1 β ($t_{12} = 0.3766$; $p = 0.714$; Figure 7e) concentrations, and IL1 β /IL-10 ratio ($t_{13} = 1.326$; $p = 0.1038$; Figure 7f). Moreover, no correlation was found between cytokines concentration in the hippocampus and memory impairment, including IL-1 β and the STM ($r = -0.083$; $p = 0.786$; $r^2 = 0.007$) and IL-1 β and the LTM recognition index ($r = -0.081$; $p = 0.773$; $r^2 = 0.006$).

Frontal cortex analysis

The results of the prefrontal cortex analysis are expressed in Figures 8a-g. Compared to the CON group, D-GAL administration increased hydroperoxide levels ($t_{12} = 2.179$; $p = 0.049$; Figure 8b) in the prefrontal cortex after 8-weeks of the intervention. No significant difference was found in the TBARS concentrations ($t_{10} = 0.9037$; $p = 0.384$; Figure 8a). Moreover, no correlation was found between oxidative stress in the prefrontal cortex and memory impairment for TBARS levels and short-term ($r = -0.126$; $p = 0.695$; $r^2 = 0.016$) and long-term memory ($r = -0.459$; $p = 0.132$; $r^2 = 0.211$) or hydroperoxides levels for short-term ($r = -0.386$; $p = 0.172$; $r^2 = 0.149$) and long-term memory ($r = -0.478$; $p = 0.083$; $r^2 = 0.228$).

When analyzing the cytokines pro- and anti-inflammatory, the aging rats showed the lowest values ($t_{14} = 2.224$; $p = 0.044$; Figure 8e) of the IL-10 concentration compared to the CON group, in the prefrontal cortex after 8- weeks. No significant difference was found in the TNF- α ($t_{14} = 1.046$; $p = 0.314$; Figure 8c), and IL-1 β ($t_{11} = 1.754$; $p = 0.107$; Figure 8d). The aging rats also showed higher values in the IL-1 β /IL-10 ratio ($t_{10} = 4.840$; $p < 0.001$; Figure 8f) when compared to the CON group. A significant, and inverse correlation ($r = -0.812$; $p < 0.001$; $r^2 = 0.660$; Figure 8g) was found between IL-1 β concentration in the prefrontal cortex and LTM recognition index, demonstrating the role of pro-inflammatory cytokine on the memory impairment. No significant correlation was found between the concentration

of IL-1 β in the frontal cortex and the STM recognition index ($r = -0.028$; $p < 0.001$; $r^2 = 0.925$).

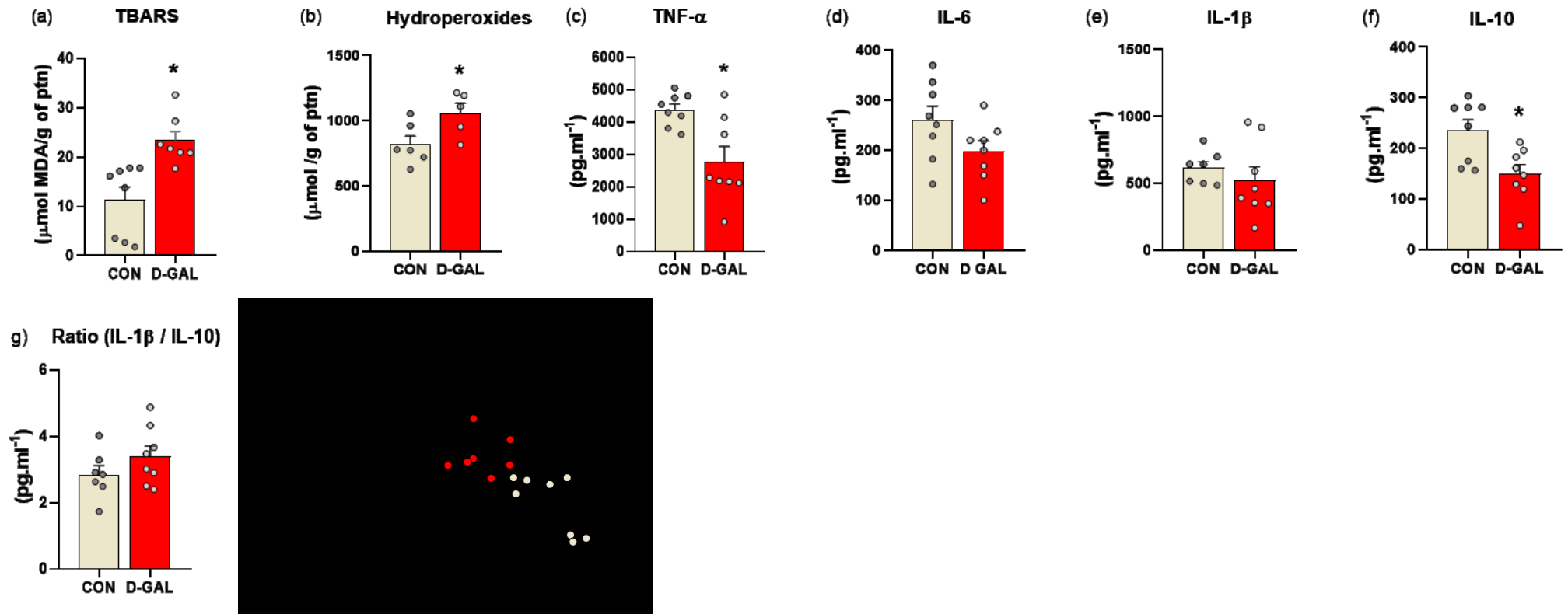


Figure. 7. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), hydroperoxides and cytokines concentrations and Pearson's correlation in the hippocampus after 8 weeks of D-GAL.

a) TBARS - Hippocampus; b) Hydroperoxides – Hippocampus; c) TNF- α – Hippocampus; d) IL-6 – Hippocampus; e) IL-1 β – Hippocampus; f) IL-10 – Hippocampus; f) Ratio IL-1 β / IL-10 – Hippocampus; h) Pearson's correlation (LTM / TBARS) – Hippocampus. Mean $\pm$ SEM. Student's T-test and Pearson's correlation. * Significant difference vs. CON. Tbars ($p < 0.05$); Hydroperoxides ($p < 0.05$); TNF- α ($p < 0.01$) and IL-10 ($p < 0.001$). CON ($n = \leq 8$); D-GAL ($n = \leq 8$).

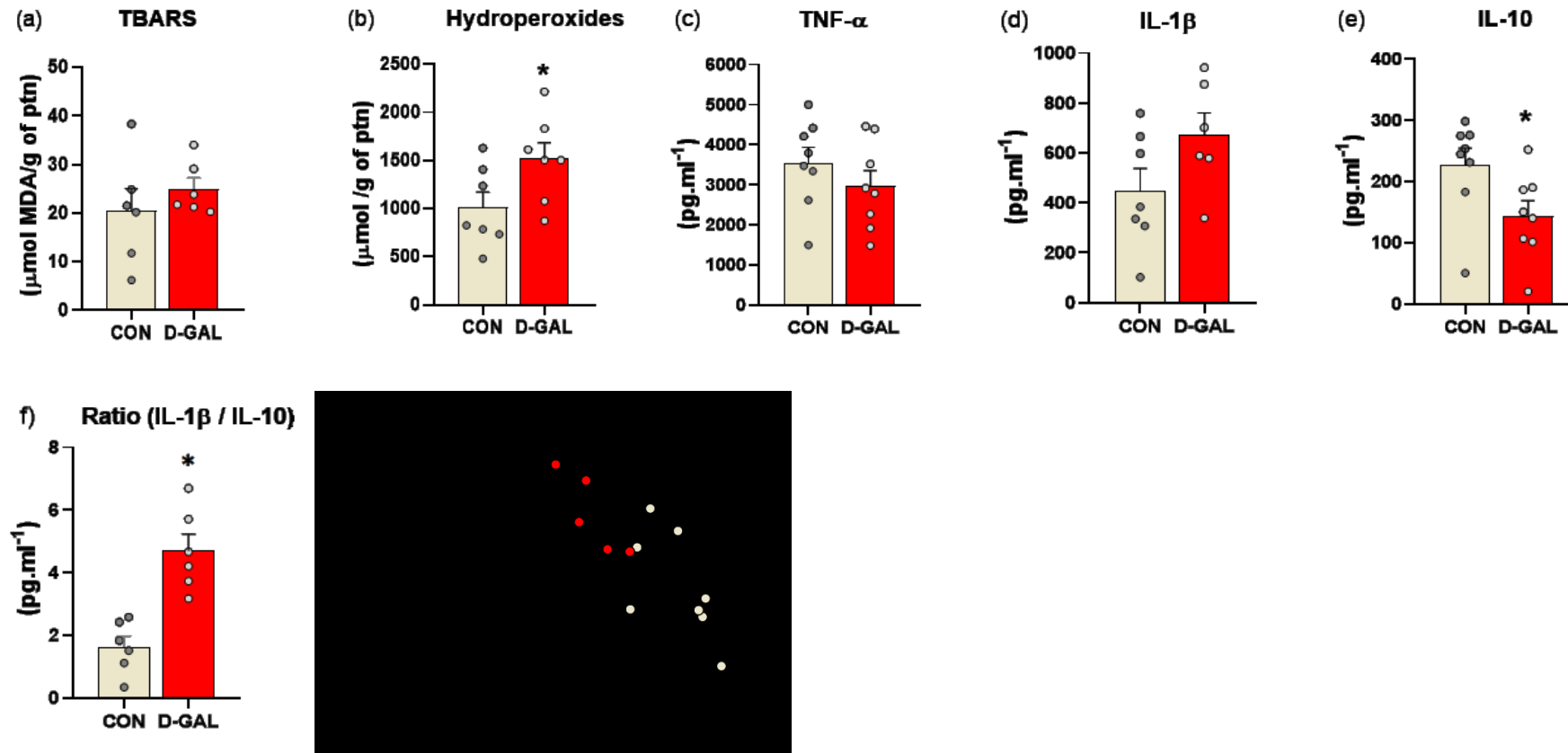


Figure 8. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), hydroperoxides and cytokines concentrations and Pearson's correlation in the frontal cortex after 8 weeks of D-GAL. a) TBARS – frontal cortex; b) Hydroperoxides – frontal cortex; c) TNF- α – frontal cortex; d) IL-1 β – frontal cortex; e) IL-10 – Prefrontal cortex; f) IL-1 β / IL-10 ratio – frontal cortex milieu; g) Pearson's correlation (IL-1 β / LTM) – Prefrontal cortex. Mean $\pm$ SEM. Student's T-test and Pearson's correlation. * Significant difference vs. CON. Hydroperoxides ($p < 0.05$); IL-10 ($p < 0.05$) and IL-1 β / IL-10 ratio ($p < 0.01$). CON ($n = \leq 8$); D-GAL ($n = \leq 8$).

DISCUSSION

Aging caused by D-GAL administration decreased aerobic capacity in both short and long-term memory and was associated with increased oxidative stress in the EDL muscle, as well as in the hippocampus and prefrontal cortex. In addition, D-GAL aging was found to promote a pro-inflammatory *126ilieu* increase in the soleus muscle, hippocampus and prefrontal cortex. Although ageing is associated with reduction in muscle strength and mass, in the present study no significant changes were found in body mass, muscle mass and relative muscle strength in D-GAL aged rats.

The main finding of this study was a decrease in aerobic capacity in rats experimentally aged by D-GAL, including VO₂peak, total exercise time and ability to perform work. Few studies have verified the ability to perform physical exercise, either by assessing locomotor activity in open field and Morris water maze behavioral tests (PARTADIREDDJA *et al.*, 2018; XINGUA *et al.*, 2023), including the dose of D-GAL, 2023), including the dose of 150 mg-1.kg-1.day-1 of D-GAL i.p. for 6 weeks (ZHANG *et al.*, 2023) or by voluntary wheel running (BELVIRANLI M, OKUDAN N, 2019; LEE *et al.*, 2019), without however assessing the maximum oxidative capacity of the animals. Therefore, in an unprecedented way, the present study demonstrated that the aging protocol via D-GAL administration reduced maximum aerobic capacity.

In humans, experimental studies have shown that aging is associated with a reduction in VO₂max (SHEPARD *et al.*, 2009), the arteriovenous difference, reduced cardiac output, mitochondrial biogenesis, muscle blood flow and increased peripheral resistance, leading to endothelial dysfunction and lower muscle oxidative capacity, thus impairing the performance of daily tasks (SCHRAGE *et al.*, 2007; BETIK; HEPPLER, 2008; GARATACHEA *et al.*, 2015; CHODZKO-ZAJKO *et al.*, 2009; PANDEY *et al.*, 2020).

Associated with decreased aerobic physical performance, animal studies have shown that increased oxidative stress assessed by lipid hydroperoxides in skeletal muscle may contribute to reduced aerobic capacity during aging (YANAR *et al.*, 2019). In the present study, rats aged by D-GAL showed a significant increase in the concentration of lipid hydroperoxides in the EDL muscle in which this increase was inversely correlated with the total exercise time until fatigue.

Previous studies have shown that D-GAL, administered at a dose of 60 mg-1.kg-1.day-1 i.p. for 6 weeks in rats, induced an increase in the concentration of lipid hydroperoxides in skeletal muscle, causing mitochondrial dysfunction, an increase in the content of carbonyl proteins (a marker of oxidative damage) and an impairment in muscle redox homeostasis (YANAR *et al.*, 2019). The mitochondrial dysfunction caused by aging in skeletal muscle, specifically in EDL, a muscle that predominantly has type II fibers, has been related to an increase in reactive oxygen species and cell apoptosis (GOMES *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2022), and with a decrease in aerobic physical performance caused by a decline in the activity of the cytochrome oxidase enzyme complex IV (BETIK; HEPPLER, 2008) and muscle strength caused by dysfunction in the activity of complex I (CHANG *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2022).

In the present study, the results showed that IL-10 concentrations in the soleus muscle were reduced in rats aged by D-GAL, evidencing a decrease in the anti-inflammatory capacity of this tissue. In this sense, the reduction of IL-10 in skeletal muscle as a result of the aging process may be associated with greater activation of macrophages, release of antigens and inflammatory cytokines (HACHAM *et al.*, 2004; MOORE *et al.*, 2001; MITTAL; ROCHE., 2015 DAGDEVIREN *et al.*, 2017). In the present study, we showed that IL-10 was correlated with aerobic performance assessed by VO₂peak. Corroborating our results, higher concentrations of IL-10 in blood serum have been directly correlated with better aerobic fitness (VO₂max) in the elderly (ROSADO-PEREZ; MENDOZA-NUNEZ, 2018). In addition to that, when we analyze the pro-inflammatory ratio between IL-1 β / IL-10 in the soleus muscle, we see an inflammatory *milieu* in this tissue. The chronic and low-grade pro-inflammatory state found in aging can be explained by the increased activation of the transcription factor signaling pathway (NF- κ B) that regulates the production of pro-inflammatory cytokines, which are activated by the increased production of oxidative stress, impaired autophagy, DNA damage and an increase in senescent cells in various tissues of the body (BEKTAS *et al.*, 2017; FRANCHESCHI *et al.*, 2018).

Regarding the memory, the results of this study showed that memory was negatively affected by D-GAL. These results corroborate data in the literature showing memory impairment assessed by the Object Recognition Test in rats and mice given a dose of 150 mg-1.kg-1.day-1 of D-GAL for eight weeks (DUAN *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2021), 6 weeks (SUN *et al.*, 2018) and 10 weeks (NAN *et al.*, 2019). As found in our study, reduced cognitive ability was accompanied by

increased oxidative stress in the hippocampus and prefrontal cortex associated with an inverse correlation between higher TBARS concentrations and decreased MLP.

The hippocampus and prefrontal cortex are structures associated with memory formation and learning, and the hippocampus is more vulnerable to oxidative stress (GARCEZ *et al.*, 2021). Our results showed that in the hippocampus the production of TBARS and lipid hydroperoxides was increased in rats aged by D-GAL. These data corroborate the literature, which found higher hippocampal TBARS and MDA concentrations in rats given 100 mg-1.kg-1.day-1 of D-GAL for 8 (GARCEZ *et al.*, 2021) and 6 weeks (BUDNI *et al.*, 2016) and at a dose of 150 mg-1.kg-1.day-1 for 8 weeks (BANJI *et al.*, 2014). This increase in oxidative stress can be explained by the deleterious action of D-GAL, which can promote an increase in EROS and consequently cause oxidative damage in the brain (ULLAH *et al.*, 2015; YARIBEYGI *et al.*, 2018).

When we evaluated the prefrontal cortex, our results also showed that lipid hydroperoxide concentrations were increased in the prefrontal cortex in the D-GAL group, indicating increased oxidative stress.

Accompanied by oxidative stress, several review and basic research studies support that chronic systemic administration of intraperitoneal or subcutaneous D-Gal can induce CNS inflammation (SADIGH-ETEGHAD *et al.*, 2017; AZMAN; ZAKARIA, 2019; LIN *et al.*, 2020; KUMARI *et al.*, 2022). The mechanisms by which D-GAL promotes neuroinflammation are related to excessive amounts of this sugar in the body that are catalyzed by the enzyme galactose oxidase into aldose and hydrogen peroxide that generate EROS by oxidative metabolism and glycosylation that activate NF-KB and its transcriptional action on inflammatory cytokines (KUMARI *et al.*, 2022). In the present study, our results showed that IL-10 concentrations in the hippocampus and prefrontal cortex were reduced, evidencing an attenuation in the anti-inflammatory capacity after the intervention with D-GAL.

The results found for IL-10 in the hippocampus and prefrontal cortex corroborate previous studies in rodents that showed a decrease in the concentration of this cytokine in Sprague-Dawley rats and Swiss albino mice using a dosage of 150 and 100 mg-1.kg-1.day-1 for 8 and 6 weeks of D-GAL, respectively (ZHANG *et al.*, 2021; KUMARI *et al.*, 2022).

In the present study, the concentrations of pro-inflammatory cytokines in the hippocampus and prefrontal cortex were not altered when comparing the aged rats to

the control group. These data differ from the literature, which points to an increase in the concentration of these cytokines in the brain and blood plasma of animals aged by D-Gal (ZHAO *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2021). On the other hand, when we analyzed the pro-inflammatory ratio of IL-1 β / IL-10 in the prefrontal cortex, inflammation was increased in the D-GAL group, indicating an inflammatory *milieu* (KUMARI *et al.*, 2022). In addition, an inverse correlation was found between higher IL-1 β concentrations and a decrease in long-term memory (LTM). Previous studies have shown that high concentrations of IL-1 β in the brains of aged animals induced by lipopolysaccharide (LPS), an important activator of the immune response, had detrimental effects on long-term memory in response to neuroinflammation due to hyperactivity of the microglia associated with greater induction of IL-1 β (HENRY *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2008; HUANG; SHENG *et al.*, 2010).

Unexpectedly, the concentration of the cytokine TNF- α in the hippocampus showed a significant decrease in the D-GAL group when compared to the control group, indicating an attenuation of this cytokine in this region, although there was no change in the prefrontal cortex. As shown in previous studies, D-GAL can induce an increase in TNF- α in the hippocampus (KUMARI *et al.*, 2022). TNF- α binds to its receptors which stimulate the transcription and production of the enzyme I κ B kinase, the phosphorylation of the I κ B protein complex by the κ B inhibitory kinase (IKK) activates NF- κ B promoting the transcription of TNF- α (BATISTA ML, JR. *et al.*, 2009; DHINGRA *et al.*, 2009). Although neurodegeneration is involved with inflammatory processes, in the present study the reduction in memory impairment may be more associated with the increase in oxidative stress induced by D-GAL than with inflammation.

In the present study, we demonstrated an inverse correlation between the increase in TBARS in the hippocampus and long-term memory. Review studies have shown that aging by administration of D-GAL with different dosages, administration time and strains associated with increased oxidative stress can promote memory impairment (SADIGH-ETEGHAD *et al.*, 2017; AZMAN; ZAKARIA, 2019) similar to what is found in elderly people. Oxidative stress is considered the main causative factor of neurodegenerative diseases (REHMAN *et al.*, 2017). The cellular redox imbalance caused by aging in oxidative metabolism promotes an increase in EROS that culminates in the oxidation of lipids, proteins, DNA damage and increased

oxidative stress, impairing cell function, promoting neuronal death and memory impairment (HERMANN *et al.*, 2014; REHMAN *et al.*, 2017; BUDNI *et al.*, 2016).

In this study, we found that increased oxidative stress may be a pathway that could explain memory loss with ageing.

CONCLUSION

In the present study, it was observed that D-GAL demonstrated effectiveness in promoting the reduction of aerobic physical performance and memory, associated with oxidative damage in the EDL muscle, as well as in the hippocampus and prefrontal cortex. Additionally, it was found that its administration caused inflammation in the soleus muscle and neuroinflammation in the hippocampus and prefrontal cortex of rats. Therefore, the use of D-Gal appears to be a promising model for investigating the deleterious effects of aging on maximum aerobic capacity.

REFERENCES

- AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxid Med Cell Longev.**, [s. l.], v. 2014, p. 360438, 2014.
- AZMAN, K. F.; ZAKARIA, R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview. **Biogerontology**, [s. l.], v. 20, n. 6, p. 763-782, 2019.
- BEVINS, R. A.; BESHEER, J. Object recognition in rats and mice: A one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory". **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 1306–1311, 2006.
- ANDREW C.BETIKA.C. BETIK AND RUSSELL T.HEPPLER.T. HEPPLER. Determinants of VO2 max decline with aging: an integrated perspective. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism.**, [s. l.], v. 33, p. 130-140, 2008.
- BATISTA JUNIOR, M. L.; LOPES, R. D.; SEELAENDER, M. C.; LOPES, A. C. Anti-inflammatory effect of physical training in heart failure: role of TNF-alpha and IL-10. **Arq Bras Cardiol.**, [s. l.], v. 93, n. 6, p. 643-51, 2009.

BANJI, O. J.; BANJI, D.; CH, K. Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain. **Food Chem Toxicol.**, [s. l.], v. 74, p. 51-9, 2014.

BUDNI, J.; PACHECO, R.; DA SILVA, S.; *et al.* Oral administration of d-galactose induces cognitive impairments and oxidative damage in rats. **Behav Brain Res.**, [s. l.], v. 302, p. 35-43, 2016.

BEKTAS A, SCHURMAN SH, SEN R, FERRUCCI L. human T cell immunosenescence and inflammation in aging. **J Leukoc Biol.**, v. 102, p. 977–88, 2017.

BELVIRANLI, M.; OKUDAN, N. Voluntary, involuntary and forced exercises almost equally reverse behavioral impairment by regulating hippocampal neurotrophic factors and oxidative stress in experimental Alzheimer's disease model. **Behav Brain Res.**, [s. l.], v. 364, p. 245-255, 2019.

BELLETTINI-SANTOS, T.; GARCEZ, M. L.; MINA, F.; *et al.* Vitamin D3 improves spatial memory and modulates cytokine levels in aged rats. **Metab Brain Dis.**, [s. l.], v. 38, n. 4, p. 1155-1166, 2023.

CUI, X. U.; ZUO, P.; ZHANG, Q.; *et al.* Chronic systemic D-galactose exposure induces memory loss, neurodegeneration, and oxidative damage in mice: Protective effects of R- α -lipoic acid. **J Neurosci Res.**, [s. l.], v. 83, n. 8, p. 1584-1590, 2006.

CHODZKO-ZAJKO, W. J.; PROCTOR, D. N.; FIATARONE SINGH, M. A.; *et al.* American College of Sports Medicine position stand. Exercise and physical activity for older adults. **Med Sci Sports Exerc.**, [s. l.], v. 41, p. 1510–530, 2009.

CASSILHAS, R. C.; LEE, K. S.; FERNANDES, J.; *et al.* Spatial memory is improved by aerobic and resistance exercise through divergent molecular mechanisms. **Neuroscience**, [s. l.], v. 202, p. 309-317, 2012.

CHANG, L.; LIU, X.; LIU, J.; *et al.* D-galactose induces a mitochondrial complex I deficiency in mouse skeletal muscle: potential benefits of nutrient combination in ameliorating muscle impairment. **J Med Food.**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 357-64, 2014.

CARDOSO, A.; MAGANO, S.; MARRANA, F.; ANDRADE, J. P. D-Galactose High-Dose Administration Failed to Induce Accelerated Aging Changes in Neurogenesis, Anxiety, and Spatial Memory on Young Male Wistar Rats. **Rejuvenation Res.**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 497-507, 2015.

CHEN, H.; LONG, Y.; GUO, L. Antiaging effect of inula Britannica on aging mouse model induced by D-galactose. **Evid Based Complement Altern Med.**, [s. l.], 6049083, 2016.

CHEN P, CHEN F, ZHOU B. Antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of ellagic acid in liver and brain of rats treated by D-galactose. **Sci Rep.** 2018 Jan 23;8(1):1465.

CRUNFLI, F.; VRECHI, T. A.; COSTA, A. P.; *et al.* Cannabinoid Receptor Type 1 Agonist ACEA Improves Cognitive Deficit on STZ-Induced Neurotoxicity Through Apoptosis Pathway and NO Modulation. **Neurotoxicity Research**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 516–529, 2019.

DUAN, D-D.; WANG, K-X.; ZHOU, Y-Z.; *et al.* Baicalein exerts beneficial effects in d-galactose-induced aging rats through attenuation of inflammation and metabolic dysfunction. **Rejuvenation res.**, Larchmont, NY, v. 20, n. 6, p. 506-516, 2017.

DHINGRA S, SHARMA AK, ARORA RC, SLEZAK J, SINGAL PK. IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. **Cardiovasc Res.** 2009 Apr 1;82(1):59-66. doi: 10.1093/cvr/cvp040. Epub 2009 Jan 30. PMID: 19181934.

DAGDEVIREN, S.; JUNG, D. Y.; FRIEDLINE, R. H.; *et al.* IL-10 prevents aging-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle. **FASEB J.**, [s. l.], v. 31, n. 2, p. 701-710, 2017.

MAGALHÃES, C. O. D. e; OLIVEIRA, L. R. S. de; SANTOS, S. T...; *et al.* Nandrolone decanoate reduces the positive effects of resistance training on cognition, anxious behavior, and hippocampal morphology in rats. **Research, Society and Development**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. e10511830600, 2022.

FRANCESCHI, C.; GARAGNANI, P.; PARINI, P.; *et al.* Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. **Nat Rev Endocrinol.**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. 576-590, 2018.

GARATACHEA, N.; PAREJA-GALEANO, H.; SANCHIS-GOMAR, F.; *et al.* Exercise attenuates the major hallmarks of aging. **Rejuvenation Research**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 57–89, 2015.

GARCEZ, M. L.; CASSOMA, R. C. S.; MINA, F.; Folic acid prevents habituation memory impairment and oxidative stress in an aging model induced by D-galactose. **Metab Brain Dis.**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 213-224, 2021.

GOMES, F. G. N.; FERNANDES, J.; CAMPOS, D. V.; *et al.* The beneficial effects of strength exercise on hippocampal cell proliferation and apoptotic signaling is impaired by anabolic androgenic steroids. **Psychoneuroendocrinology**, [s. l.], v. 50, p. 106-117, 2014.

GOMES, M. J.; MARTINEZ, P. F.; PAGAN, L. U.; *et al.* Skeletal muscle aging: Influence of oxidative stress and physical exercise. **Oncotarget.**, [s. l.], v. 8, p. 20428, 2017.

HENRY CJ, HUANG Y, WYNNE AM, GODBOUT JP. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. **Brain Behav Immun.**, [s. l.], v. 23, p. 309-317, 2009.

HUANG Y, HENRY CJ, DANTZER R, JOHNSON RW, GODBOUT JP. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. **Neurobiol Aging.**, [s. l.], 29: 1744-1753, 2008.

HUANG ZB, SHENG GQ. Interleukin-1 β with learning and memory. **Neurosci Bull.** [s. l.], Dec;26(6):455-68. 2010.

P.M. HERMANN, S.N. WATSON, W.C. WILDERING, Phospholipase A2—nexus of aging, oxidative stress, neuronal excitability, and functional decline of the aging nervous system? Insights from a snail model system of neuronal aging and age-associated memory impairment, **Front. Genet.** [s. l.], 5 419, 2014

HACHAM, M.; WHITE, R. M.; ARGOV, S.; SEGAL, S.; APTE, R. N. Interleukin-6 and interleukin-10 are expressed in organs of normal young and old mice. **Eur. Cytokine Netw.**, [s. l.], v. 15, p. 37–46, 2004.

ISAAC, A. R.; LIMA-FILHO, R. A. S.; LOURENÇO, M. V. How does the skeletal muscle communicate with the brain in health and disease? **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 197, 108744, 2021.

KUMARI, M.; DASRIYA, V. L.; NATARAJ, B. H.; NAGPAL, R.; BEHARE, P. V. Lactobacillus rhamnosus-Derived Exopolysaccharide Attenuates D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Inflammatory Brain Injury and Modulates Gut Microbiota in a Mouse Model. **Microorganisms.**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 2046, 2022.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem.**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. The hallmarks of aging. **Cell.**, [s. l.], v. 153, n. 6, p. 1194-217, 2013.

LEE, J. Y.; PAIK, I. Y.; KIM, J. Y. Voluntary exercise reverses immune aging induced by oxidative stress in aging mice. **Exp Gerontol.**, [s. l.], v. 115, p.148-154, 2019.

LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clin Interv Aging.**, [s. l.], v. 13, p. 757-772, 2018.

LIN, J-Y.; KUO, W-W.; BASKARAN, R.; *et al.* Swimming exercise stimulates IGF1/PI3K/Akt and AMPK/SIRT1/PGC1 α survival signaling to suppress apoptosis and inflammation in aging hippocampus. **Aging.**, Albany, NY, v. 12, n. 8, p. 6852, 2020.

MITTAL S. K.; ROCHE P. A. Suppression of antigen presentation by IL-10. **Curr. Opin. Immunol.**, [s. l.], v. 34, p. 22–27, 2015.

MOORE, K. W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, [s. l.], v. 19, p. 683–765, 2001.

MELO, B. P.; ZACARIAS, A. C.; OLIVEIRA, J. C. C.; *et al.* Combination of Aerobic Training and Cocoa Flavanols as Effective Therapies to Reduce Metabolic and Inflammatory Disruptions in Insulin-Resistant Rats: The Exercise, Cocoa, and Diabetes Study. **Int J Sport Nutr Exerc Metab.**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 89-101, 2022.

NAM, S. M.; SEO, M.; SEO, J. S.; *et al.* Ascorbic Acid Mitigates D-galactose-Induced Brain Aging by Increasing Hippocampal Neurogenesis and Improving Memory Function. **Nutrients.**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 176, 2019.

PRÍMOLA-GOMES, T. N.; CAMPOS, L. A.; LAUTON-SANTOS, S.; *et al.* Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes. **J Appl Physiol.**, [s. l.], v. 107, n. 2, p. 593-598, 2009.

PANDEY, A. KRAUS, W. E.; BRUBAKER, P. H.; KITZMAN, D. W. Healthy Aging and Cardiovascular Function: Invasive Hemodynamics During Rest and Exercise in 104 Healthy Volunteers. **JACC Heart Fail.**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 111-121, 2020.

PARTADIREDDA, G.; KARIMA, N.; UTAMI, K. P.; *et al.* The Effects of Light and Moderate Intensity Exercise on the Femoral Bone and Cerebellum of d-Galactose-Exposed Rats. **Rejuvenation Res**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 20-30, 2019.

REHMAN SU, SHAH SA, ALI T, CHUNG JI, KIM MO. Anthocyanins Reversed D-Galactose-Induced Oxidative Stress and Neuroinflammation Mediated Cognitive Impairment in Adult Rats. **Mol Neurobiol.** [s. l.], Jan;54(1):255-271 2017.

ROJAS, J. J. *et al.* Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. **Experimental Neurology**, v. 241, n. 1, p. 25–33, 2013.

ROSADO-PÉREZ J, MENDOZA-NÚÑEZ VM. Relationship Between Aerobic Capacity With Oxidative Stress and Inflammation Biomarkers in the Blood of Older Mexican Urban-Dwelling Population. **Dose Response**. [s. l.], Apr 29;16(2):2018.

SADIGH-ETEGHAD, S.; MAJDI, A.; MCCANN, S. K.; *et al.* D-galactose-induced brain ageing model: a systematic review and meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices. **PloS one**, [s. l.], v. 12, n. 8, p. e0184122, 2017.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3. ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007.

SCHRAGE, W. G.; EISENACH, J. H.; JOYNER, M. J. Ageing reduces nitric-oxide- and prostaglandin-mediated vasodilatation in exercising humans. **J Physiol.**, [s. l.], v. 579, p. 227–236, 2007.

SHEPHARD, R. J. Maximal oxygen intake and independence in old age. **Br J Sports Med.**, [s. l.], v. 43, p.342–346, 2009.

SOARES, A. D. N., WANNER, S. P., MORAIS, E. S. S.; *et al.* Supplementation with *Saccharomyces boulardii* Increases the Maximal Oxygen Consumption and Maximal Aerobic Speed Attained by Rats Subjected to an Incremental-Speed Exercise. **Nutrients**, [s. l.], v. 11, n. 10, 2010.

SUN, K.; YANG, P.; ZHAO, R.; BAI, Y.; GUO, Z. Matrine Attenuates D-Galactose-Induced Aging-Related Behavior in Mice via Inhibition of Cellular Senescence and Oxidative Stress. **Oxid Med Cell Longev.**, [s. l.], v. 2018, p. 7108604, 2018.

TIKHONOVA, M. A.; YU, C. H.; KOLOSOVA, N. G.; *et al.* Comparison of behavioral and biochemical deficits in rats with hereditary defined or D-galactose-induced accelerated senescence: evaluating the protective effects of diosgenin. **Pharmacol Biochem Behav.**, [s. l.], v. 120, p. 7-16, 2014.

ULLAH, F.; ALI, T.; ULLAH, N.; KIM, M. O. Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain. **Neurochem Int.**, [s. l.], v. 90, p. 114-24, 2015.

WU, X.; YU, X.; ZHU, N.; XU, M.; LI, Y. Beneficial effects of whey protein peptides on muscle loss in aging mice models. **Front Nutr.**, [s. l.], v. 9 p. 897821, 2022.

XINGHUA, L.; YINGYING, H.; SHUAI, W.; GUANGPING, L. Anti-aging Effect of Rutin in *Caenorhabditis elegans* and D-Gal-Induced Aging Mouse Model. **Dokl Biochem Biophys.**, [s. l.], v. 513, n. 1, p. 350-354, 2023.

XU, F. **Sub-acute toxicity of D-galactose**. In: Proceedings of the Second National Conference on Aging Research, Herbin, China, 1985.

YANAR, K.; SIMSEK, B.; ATUKEREN, P.; AYDIN, S.; CAKATAY, U. Is D-Galactose a Useful Agent for Accelerated Aging Model of Gastrocnemius and Soleus Muscle of Sprague-Dawley Rats? **Rejuvenation Res.**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 521-528, 2019.

YARIBEYGI, H.; PANAHI, Y.; JAVADI, B.; SAHEBKAR, A. The Underlying Role of Oxidative Stress in Neurodegeneration: A Mechanistic Review. **CNS Neurol Disord Drug Targets.**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 207-215, 2018.

ZHAO, B., REN, B., GUO, R., ZHANG, W., MA, S., YAO, Y., YUAN, T., LIU, Z., LIU, X., Supplementation of lycopene attenuates oxidative stress induced neuroinflammation and cognitive impairment via Nrf2/NF- κ B transcriptional pathway, **Food and Chemical Toxicology** (2017).

ZHANG, B.; LIAN, W.; ZHAO, J.; WANG, Z.; LIU, A.; DU, G. DL0410 Alleviates Memory Impairment in D-Galactose-Induced Aging Rats by Suppressing Neuroinflammation via the TLR4/MyD88/NF- κ B Pathway. **Oxid Med Cell Longev.**, [s. l.], v. 2021, p. 6521146, 2021.

ZHANG, J.; GAO, Q.; GAO, J.; *et al.* Moderate-Intensity Intermittent Training Alters the DNA Methylation Pattern of PDE4D Gene in Hippocampus to Improve the Ability of Spatial Learning and Memory in Aging Rats Reduced by D-Galactose. **Brain Sci.**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 422, 2023.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA–UFMG)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeitos do treinamento físico combinado associado à suplementação de flavonol sobre a memória, marcadores inflamatórios, estresse oxidativo e fatores neurotróficos em um modelo experimental de envelhecimento.", protocolo do CEUA: 161/2020 sob a responsabilidade de Danusa Dias Soares 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 nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 26/10/2020.

Vigência da Autorização	26/10/2020 a 25/10/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	9
Peso/Idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Ge
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	9
Peso/Idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Ge
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	11
Peso/Idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Ge
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	11
Peso/Idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Ge
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	11
Peso/Idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino

Origem	Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Ge
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	11
Peso/Idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Ge
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	11
Peso/Idade	250g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Ge

Considerações posteriores:

26/10/2020	Aprovado na reunião on-line do dia 26/10/2020. Validade: 26/10/2020 à 25/10/2025
------------	---

Belo Horizonte, 26/10/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B – Certificado de capacitação no uso e manejo de animais de laboratório



**República Federativa do Brasil
Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas**

O Diretor do Instituto de Ciências Biomédicas, nos termos do artigo 74, parágrafo único, inciso 5, alínea "b", do Estatuto da Universidade de São Paulo, certifica que

Daniel Massote de Melo Leite



de nacionalidade brasileira,
portador da cédula de identidade RG nº MG12584687 MG,
nascido a 2 de novembro de 1988 e natural do Estado de Minas Gerais,
concluiu o



**Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão:
Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório**

E, para que possa gozar de todos os direitos e prerrogativas legais, outorga-lhe o presente
Certificado.

São Paulo, 01 de junho de 2020

**Presidente da Comissão de Cultura e
Extensão Universitária**

Alda Maria Backx Noronha Madeira

Diretor

Luis Carlos de Souza Ferreira

Código de controle: **3WB9-S1Q9-SNDH-DGAY**

Período do Curso: **25/05/2020 a 28/05/2020**
Carga Horária: **60:00 horas**
Frequência: **100.00%**
Área de Conhecimento: **Manejo de Animais**
Avaliação Final: **Aprovado**

Credenciamento junto ao MEC através da Portaria nº 48, de 22 de janeiro de 2013.