



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Ricardo de Andrade Soares

**Efeito do extrato de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) e do exercício físico sobre as alterações vasculares e de memória ocasionadas pelo envelhecimento**

Rio de Janeiro

2021

Ricardo de Andrade Soares

**Efeito do extrato de Euterpe oleracea Mart. (Açaí) e do exercício físico sobre as alterações vasculares e de memória ocasionadas pelo envelhecimento**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela de Castro Resende  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayane Teixeira Ognibene

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S676 Soares, Ricardo de Andrade.  
Efeito do extrato de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) e do exercício físico sobre as alterações vasculares e de memória ocasionadas pelo envelhecimento / Ricardo de Andrade Soares. - 2021.  
133f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela de Castro Resende  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayane Teixeira Ognibene

Doutorado (Tese) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Açaí – Efeitos fisiológicos – Teses. 2. Euterpe – Teses. 3. Exercícios físicos - Teses. 4. Envelhecimento cognitivo. I. Resende, Ângela de Castro. II. Ognibene, Dayane Teixeira. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 615.711

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Ricardo de Andrade Soares

**Efeito do extrato de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) e do exercício físico sobre as alterações vasculares e de memória ocasionadas pelo envelhecimento**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de novembro 2021.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayane Teixeira Ognibene

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes– UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Angela de Castro Resende (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof. Dr. Claudio Carneiro Filgueiras  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Claudia Lúcia Martins da Silva  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Renata Frauches Medeiros  
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2021

## DEDICATÓRIA

Dedico à todos aqueles que sempre estiveram ao meu lado durante a minha trajetória profissional e pessoal.

## AGRADECIMENTOS

À minha primeira base familiar: Minha mãe e meu irmão, pelo carinho, paciência e apoio em minhas escolhas. Aos demais familiares, tios, tias, primos e primas, agregados e todos aqueles que me circundam, agradeço imensamente pelo apoio.

À Isabelle Santos Xavier Dias, pelo lar que construímos juntos, obrigado pela amizade, companheirismo e por todos os momentos que compartilhamos durante todos esses anos.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Ângela de Castro Resende, pela oportunidade de desenvolver o projeto no laboratório, aprendi muito nesses últimos anos com sua visão meticulosa e correta na execução de um bom trabalho, sou grato por tudo.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Dayane Ognibene, sempre lançando um olhar atencioso e efetivo sobre a execução de um trabalho.

Às Prof.<sup>a</sup> Dra. Grazielle Freitas de Bem e Dra. Cristiane Aguiar Costa por todo auxílio e apoio nesse período. Sou muito grato por toda ajuda e amizade de vocês.

À Lenize Costa dos Reis Carvalho, por seus ensinamentos e pelo grande apoio no desenvolvimento do trabalho, ensinou-me as bases do trabalho prático, além de ser uma “mãezona” no laboratório. Muito obrigado, mesmo.

À todos os amigos e colegas do LFCPM: Beatriz Oliveira, Matheus Pontes, Matheus Henrique, Dafne Lopes, Marcella Machado, Flávia Santos, Douglas Valquintans, Mariana Alencar, Caroline Alves e Bernardo Junqueira . Sou muito grato por fazer parte de uma equipe tão amiga, agradável e divertida de se trabalhar. Obrigado a todos.

Aos grandes amigos durante a faculdade, Camila Cavalieri, Bianca Saguie, Ana Clara Frony, Fabio Sousa, Filipe Gabriel, Juliana Vilhena e Shayane Gomes, sem a ajuda de vocês seria muito difícil chegar aonde cheguei . Obrigada por toda a ajuda e amizade..

A todos os meus bons mestres desde meu ensino fundamental até o superior que ajudaram na minha formação pessoal e profissional.

A todos aqueles que contribuíram para esse trabalho de forma direta ou indireta e que não foram citados.

## RESUMO

SOARES, Ricardo Andrade. **Efeito do extrato de Euterpe oleracea Mart. (Açaí) e do exercício físico sobre as alterações vasculares e de memória ocasionadas pelo envelhecimento**. 2021. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021

O envelhecimento populacional tem aumentado ao redor do planeta. No Brasil, cerca de 70% dos idosos possuem alguma doença crônica. Diante desse quadro o tratamento das doenças crônicas na terceira idade torna-se um grande desafio para a saúde pública. Adaptações no estilo de vida que envolvam estratégias nutricionais e atividade física regular e moderada exercem um efeito protetor sobre doenças ocasionadas pelo envelhecimento. O extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE), rico em polifenóis, possui propriedades vasodilatadoras e antioxidantes. Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito do tratamento com ASE (200mg/kg) e do exercício físico na função vascular, no desempenho físico, na memória e no aprendizado de animais idosos. Ratos wistar machos foram divididos em 5 grupos: Jovem (3 meses), Idoso (18 meses), Idoso+ASE (18 meses + ASE), Idoso+Treino (18 meses + treinamento físico) e Idoso+Treino+ASE (18 meses + treinamento físico+ ASE). O teste de esforço máximo (TEM) foi desenvolvido de acordo com Matsuura et al. 2010. Foram avaliados os níveis de glicemia e lactato no plasma ao final de cada teste. O treinamento físico crônico foi realizado em esteira rolante (30 min/dia; 5 dias/semana) durante 4 semanas com intensidade de 60% da velocidade máxima atingida no TEM. A pressão arterial foi aferida uma vez por semana por pletismografia de cauda. Ao final do período experimental foi realizado o teste de esqui passiva inibitória para avaliar a memória de curto e longo prazo. Após a eutanásia, realizamos a reatividade vascular em leito arterial mesentérico (LAM) e anel de aorta, bem como avaliamos, a expressão de proteínas responsáveis pela produção de óxido nítrico em aorta e LAM, de proteínas da biogênese mitocondrial no músculo *soleus*, e de proteínas responsáveis pela neuroplasticidade no hipocampo. A atividade enzimática e o dano oxidativo também foram avaliados. A distância(m) e o tempo(s) final foram maiores ( $p \leq 0.05$ ) no grupo Idoso+Treino+ASE comparados ao grupo Idoso+Treino. O peso (g) dos animais jovens foi menor que dos Idosos durante o período experimental. Os níveis de lactato (mmol/L) e de glicemia finais não diferiram entre os grupos. Os animais do grupo Jovem apresentaram uma redução( $p \leq 0.05$ ) da resposta vasoconstritora e aumento( $p \leq 0.05$ ) da resposta vasodilatadora em relação ao grupo Idoso tanto em LAM como em aorta. Os grupos Idoso+Treino e Idoso+ASE apresentaram aumento ( $p \leq 0.05$ ) na resposta vasodilatadora em aorta e redução( $p \leq 0.05$ ) da resposta vasoconstritora comparados ao grupo Idoso, além de reduzirem ( $p \leq 0.05$ ) a pressão arterial e o dano oxidativo na aorta e no hipocampo. A associação do exercício físico com o ASE também aumentou ( $p \leq 0.05$ ) a vasodilatação em LAM em relação ao grupo Idoso e não só reduziu ( $p \leq 0.05$ ) a pressão arterial como também reverteu a perda ( $p \leq 0.05$ ) de desempenho na memória aversiva de longo prazo ocasionada pelo envelhecimento. O sinergismo entre o ASE e exercício também aumentou a defesa antioxidante ( $p < 0.05$ ) e a expressão das proteínas da biogênese mitocondrial no músculo esquelético. Com base nesses resultados demonstramos uma positiva interação da atividade física aeróbica com o ASE sobre o processo de envelhecimento ao melhorar a pressão arterial, a função vascular, o estado oxidativo, regulando positivamente as proteínas-chave da biogênese mitocondrial no músculo esquelético, o que deve contribuir para a tolerância ao exercício no envelhecimento. Também observamos o efeito benéfico da associação do extrato com o exercício físico sobre o declínio cognitivo, possivelmente devido a ação vasodilatadora e antioxidantes do extrato.

Palavras-chave: Envelhecimento. Polifenóis. Exercício físico. Disfunção Endotelial. Memória.

## ABSTRACT

SOARES, Ricardo Andrade. **Effect of the extract of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) and exercise training on vascular and memory changes caused by aging.** 2021. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

The population aging has increased around the world. In Brazil, approximately 70% of the older people have a chronic disease. So, the treatment of chronic diseases in old age becomes a great challenge for public health. Lifestyle changes involving nutritional strategies and regular and moderate exercise training can have a protective effect against diseases caused by aging. The Açaí seed extract (ASE), rich in polyphenols, demonstrated vasodilating and antioxidant properties. Therefore, the purpose of the present study is to examine the effect of treatment with ASE (200mg/kg) and exercise training on vascular function, exercise performance, memory and learning in older animals. Male Wistar rats were divided into 5 groups: Young (3 months), Old (18 months), Old+ASE (18 months+ ASE), Old+Training (18 months + exercise training) and Old+Training+ASE (18 months + exercise training + ASE). The maximum treadmill stress test (MST) was developed according to Matsuura et al. 2010. Plasma glucose and lactate levels were examined at the end of each MST. The exercise training was performed on a treadmill (30 min/day; 5 days/week) for 4 weeks. Blood pressure was measured by tail plethysmography once a week. At the end of the experimental period, the step down avoidance test was performed to examine short-term and long-term memory. After euthanasia, we performed vascular reactivity in a mesenteric arterial bed (MAB) and aortic ring as well as we evaluated the expression of proteins involved for the production of nitric oxide in the aorta and LAM, proteins involved in mitochondrial biogenesis in the soleus muscle, and key proteins for neural plasticity in hippocampus. The antioxidant defense and oxidative damage were also studied. The distance(m) and time (s) were increased ( $p \leq 0.05$ ) in the Old+Training+ASE group compared to the Old+Training group. The weight (g) of young animals was lower than that old animals during the experimental period. The lactate (mmol/L) and blood glucose levels did not differ between groups. The animals in the Young group showed a reduction ( $p \leq 0.05$ ) in the vasoconstrictor response and increase ( $p \leq 0.05$ ) in the vasodilator response compared to the Old group, both in MAB and in the aortic ring. The Old+Training and Old+ASE groups showed an increase ( $p \leq 0.05$ ) in the vasodilator response in the aorta and a reduction ( $p \leq 0.05$ ) in the vasoconstrictor response compared to the Old group, in addition to reducing ( $p \leq 0.05$ ) blood pressure and oxidative damage in the aorta and hippocampus. The association of exercise training with ASE in Old animals also increased ( $p \leq 0.05$ ) the vasodilation in MAB compared to the Old group and not only reduced ( $p \leq 0.05$ ) blood pressure but also reversed the loss ( $p \leq 0.05$ ) of performance in long-term aversive memory caused by aging. The synergism between ASE and exercise also increased the antioxidant defense ( $p < 0.05$ ) and the expression of mitochondrial biogenesis proteins in skeletal muscle. Based on the results presented, we demonstrate a positive interaction of aerobic training exercise with ASE on the aging process by improving blood pressure, vascular function, oxidative state, positively regulating key proteins of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle, which should contribute to exercise tolerance in aging. We also observed the beneficial effect of the association of the extract with exercise training on cognitive decline, possibly due to the extract's vasodilating and antioxidant action.

Keywords: Aging. Polyphenols. Exercise training. Endothelial Dysfunction. Memory.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Foto ilustrativa da <i>Euterpe oleracea</i> Mart.(açai).....	27
Figura 2-	Perfil de eluição obtido por cromatografia líquida do extrato hidroalcoólico do caroço do açai.....	28
Figura 3 -	Representação esquemática do protocolo experimental.....	33
Figura 4 -	Medida da PA pelo método da pletismografia de cauda.....	35
Figura 5 -	Teste de esquiva passiva inibitória.....	37
Figura 6 -	Isolamento do Leito arterial mesentérico.....	38
Figura 7 -	Foto do esquema de perfusão do leito arterial mesentérico.....	39
Figura 8 -	Esquema de isolamento e medida de tensão da aorta.....	42
Figura 9 -	Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o peso corporal.....	48
Figura 10 -	Comparação do efeito do tratamento com ASE sobre a distância percorrida e o tempo de exercício.....	50
Figura 11 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de lactato.....	51
Figura 12 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis glicêmicos.....	52
Figura 13 -	Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a pressão arterial.....	54
Figura 14 -	Efeito da idade sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em anel de aorta de rato.....	56
Figura 15 -	Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em anel de aorta de rato idoso.....	58
Figura 16 -	Efeito da idade sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em anel de aorta de rato.....	59

Figura 17 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em anel de aorta de rato idoso.....	61
Figura 18 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em anel de aorta de rato idoso.....	62
Figura 19 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em leito arterial mesentérico de ratos idosos.....	64
Figura 20 - Efeito da idade sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em leito arterial mesentérico.....	65
Figura 21 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre resposta vasoconstritora da norepinefrina em leito arterial mesentérico de animais idosos.....	67
Figura 22 - Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão da PI3K, AKT, p-AKT, eNOS e p-eNOS em homogenato da artéria aorta.....	68
Figura 23 - Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão da PI3K, AKT, p-AKT, eNOS e p-eNOS em homogenato de LAM.....	69
Figura 24 - Efeito do tratamento com ASE e do treinamento físico crônico na espessura da camada média da aorta.....	71
Figura 25 - Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade enzimática, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato da artéria aorta.....	73
Figura 26 - Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão da AMPK, p-AMPK, SIRT-1 e PGC-1 $\alpha$ em homogenato de tecido muscular esquelético.....	75
Figura 27 - Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre as mitocôndrias, as partículas de glicogênio e as miofibrilas do músculo esquelético.....	77

Figura 28 - Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade enzimática, o nível de Nrf-2, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato de tecido muscular esquelético.....	79
Figura 29 - Teste de Esquiva Passiva – dados brutos.....	81
Figura 30 - Teste de Esquiva Passiva (dados de diferença de tempo entre testes).....	82
Figura 31 - Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade enzimática, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato de hipocampo.....	84
Figura 32 - Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão de CREB e BDNF em homogenato de hipocampo.....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito máximo e IC50 da curva concentração-efeito da acetilcolina em anel de aorta.....	57
Tabela 2 – Efeito máximo e IC50 da curva concentração-efeito da norepinefrina em anel de aorta.....	60
Tabela 3 – Efeito máximo e ID50 da curva dose-resposta da acetilcolina em LAM.....	63
Tabela 4 – Efeito máximo e ID50 da curva dose-resposta da norepinefrina em LAM.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A $\beta$	$\beta$ -amiloide
ACh	Acetilcolina
AKT	Akt/proteína cinase B
AMPK	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina
ASE	<i>Açaí Stone Extract</i> (Extrato hidroalcoólico do caroço do açaí)
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAT	Catalase
CCL	Comprometimento cognitivo leve
CREB	Proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
ENF	Emaranhados neurofibrilares
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécies reativas de oxigênio
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPx	Glutationa peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
KCl	Cloreto de potássio
LAM	Leito arterial mesentérico
MDA	Malondialdeído
NE	Norepinefrina
Nrf-2	Fator nuclear eritroide 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido nítrico
p-AMPK	Proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina fosforilada
PAD	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
p-eNOS	Enzima sintase do óxido nítrico endotelial fosforilada

PGC-1 $\alpha$	Coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
Phe	Fenilenfrina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PKA	Proteína cinase A
PPA	Proteína precursora amiloide
SIRT-1	Sirtuína - 1
SOD	Superóxido dismutase

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
1	<b>OBJETIVO</b> .....	30
1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	30
1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	30
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
2.1	<b>Animais utilizados e modelo experimental</b> .....	31
2.2	<b>Preparo do extrato hidro alcoólico do caroço de açaí</b> .....	32
2.3	<b>Protocolo de treinamento físico</b> .....	33
2.4	<b>Dosagens séricas</b> .....	34
2.4.1	<u>Glicemia</u> .....	34
2.4.2	<u>Lactato</u> .....	34
2.5	<b>Medida da pressão arterial</b> .....	34
2.6	<b>Teste de Esquiva Passiva Inibitória (EPI)</b> .....	35
2.7	<b>Eutanásia e coleta de tecidos</b> .....	36
2.8	<b>Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM)</b> .....	37
2.9	<b>Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas</b> .....	38
2.10	<b>Isolamento do anel de aorta</b> .....	40
2.11	<b>Medida da reatividade do anel de aorta às substâncias vasoativas</b> .....	41
2.12	<b>Morfologia da aorta</b> .....	42
2.13	<b>Análise da expressão de proteínas por Western Blotting</b> .....	42
2.14	<b>Ensaio pró-oxidantes</b> .....	43
2.14.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico</u> .....	43
2.15	<b>Atividade das enzimas antioxidantes</b> .....	44
2.15.1	<u>Medida da superóxido dismutase</u> .....	44
2.15.2	<u>Medida da catalase</u> .....	45
2.15.3	<u>Medida da glutathione peroxidase</u> .....	45
2.16	<b>Dosagem de nitrito na aorta, hipocampo e tecido muscular esquelético</b> .....	46
2.17	<b>Estudo de Microscopia Eletrônica</b> .....	46

2.18	Análise estatística.....	47
3	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
3.1	<b>Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício sobre o peso corporal.....</b>	<b>48</b>
3.2	<b>Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade física no teste progressivo máximo.....</b>	<b>49</b>
3.3	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de lactato.....</b>	<b>51</b>
3.4	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de glicemia.....</b>	<b>52</b>
3.5	<b>Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico na pressão arterial.....</b>	<b>53</b>
3.6	<b>Efeito da Idade sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em anel de aorta de rato.....</b>	<b>55</b>
3.7	<b>Efeitos do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em anel de aorta de ratos Idosos.....</b>	<b>57</b>
3.8	<b>Efeito da idade sobre a resposta vasoconstrictora da norepinefrina em anel de aorta de rato.....</b>	<b>59</b>
3.9	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstrictora da norepinefrina em anel de aorta de rato idoso.....</b>	<b>60</b>
3.10	<b>Efeito da idade sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em LAM.....</b>	<b>62</b>
3.11	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em LAM de animais idosos.....</b>	<b>63</b>
3.12	<b>Efeito da idade sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em LAM.....</b>	<b>65</b>
3.13	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em LAM de animais idosos.....</b>	<b>66</b>
3.14	<b>Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento</b>	

	<b>físico sobre a expressão da AKT, p-AKT, PI3K, eNOS e p-Enos em homogenato da artéria aorta.....</b>	<b>68</b>
3.15	<b>Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão da AKT, p-AKT, PI3K, eNOS e p-Enos em homogenato de LAM.....</b>	<b>69</b>
3.16	<b>Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico na espessura da camada média da aorta.....</b>	<b>70</b>
3.17	<b>Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a atividade enzimática antioxidante, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato da artéria aorta</b>	<b>72</b>
3.18	<b>Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão da AMPK, p-AMPK, SIRT-1, e PGC-1<math>\alpha</math> e em homogenato de tecido muscular esquelético.....</b>	<b>74</b>
3.19	<b>Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre as mitocôndrias, as partículas de glicogênio e as miofibrilas do músculo esquelético.....</b>	<b>76</b>
3.20	<b>Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a atividade enzimática antioxidante, a expressão de Nrf-2, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato de tecido muscular esquelético.....</b>	<b>78</b>
3.21	<b>Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o teste de Esquiva Passiva.....</b>	<b>80</b>
3.22	<b>Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a atividade enzimática antioxidante, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato de hipocampo..</b>	<b>83</b>
3.23	<b>Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão de CREB e BDNF em homogenato de hipocampo.....</b>	<b>85</b>
4	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>86</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>99</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>
	<b>ANEXO A – Comissão de ética.....</b>	<b>112</b>
	<b>ANEXO B - Petição de depósito de patente.....</b>	<b>113</b>

## INTRODUÇÃO

O envelhecimento populacional é um fenômeno que vem ocorrendo ao redor do planeta. Segundo o relatório *World Population Ageing* das Nações Unidas, 703 milhões de pessoas em todo o mundo possuem 65 anos ou mais, idade mínima para ser considerado idoso conforme o texto, com projeção de tal valor dobrar até 2050 (Nations, 2021).

No Brasil, o Departamento Intersindical de Estatística e Estudos Socioeconômicos (Dieese) demonstrou que a população brasileira de idosos, definida a partir de 60 anos segundo o estatuto do idoso (Ministério da Saúde, 2009), encontra-se em torno de 37,7 milhões (Dieese, 2021). A OMS estima que o processo de envelhecimento da população brasileira ocorre de maneira mais acelerada do que ocorreu em países como a França, por exemplo. Enquanto o último demorou em torno de 150 anos para passar de 10% a 20% do total de sua população com 60 anos ou mais, no Brasil, assim como na China e na Índia, essa estimativa é de 20 anos para atingir a mesma porcentagem (WHO, 2015). Isso significa que a adaptação nesses países para proporcionar um envelhecimento saudável aliado a uma boa qualidade de vida, precisará ocorrer de uma maneira muito mais rápida do que costumava ser no passado (WHO, 2015). Além disso, dados do Estudo Longitudinal da Saúde dos Idosos Brasileiros (ELSI-Brasil), cerca de 40% da população de idosos no Brasil possuem uma doença crônica e cerca de 30% possuem duas ou mais doenças como diabetes, hipertensão ou artrite (Lima-Costa, 2019). No total somam-se aproximadamente 70% dos idosos no Brasil com alguma doença crônica (Lima-Costa, 2019). Diante desse quadro o tratamento das doenças crônicas na terceira idade torna-se um grande desafio para a saúde pública nacional e internacional (Lima-Costa, 2019); (WHO, 2015).

A partir de 2022, conforme consta na nova Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados com a Saúde (CID 11) da OMS, o envelhecimento será considerado uma doença (Zhavoronkov; Bhullar, 2015) (Calimport; Bentley, 2019). Segundo a entidade, tal mudança pode gerar uma maior atenção ao assunto, fornecendo uma base para ensaios clínicos, com maior participação da indústria farmacêutica e dos formuladores de políticas pública (Calimport; Bentley, 2019). Contudo, esta nova classificação não é unanimidade. A

Sociedade Brasileira de Geriatria e gerontologia (SBGG) alega que o envelhecimento é uma etapa natural de nosso curso de vida e não deveria correr o risco de ser interpretada como doença, o que contribuiria para acentuar preconceitos em relação à longevidade (SBGG, 2021). Diante deste contexto, o processo de envelhecimento e suas particularidades, só podem ser compreendidos a partir da relação que se estabelece entre os diferentes aspectos cronológicos, biológicos, psicológicos e sociais (Schneider & Irigaray, 2008). Envelhecer é um processo gradativo que envolve o desenvolvimento e o amadurecimento do indivíduo, entretanto a progressão do tempo pode acarretar em diversas perdas físicas, cognitivas e sociais exigindo intensa habilidade emocional do sujeito que envelhece a fim de obter uma adaptação saudável às mudanças desta nova fase da vida (Kreuz; Franco, 2017).

Considerando o ponto de vista biológico, o envelhecimento pode ser entendido como um processo que acarreta o declínio das funções fisiológicas levando a uma redução da taxa reprodutiva com um aumento da taxa de mortalidade (Saldmann et al., 2019). Este processo é controlado por diversos mecanismos envolvendo fatores genéticos, epigenéticos e ambientais (Forni et al., 2019). No âmbito celular, aplica-se o conceito de senescência celular, condição na qual uma célula se torna disfuncional. A senescência pode ser dividida em duas grandes categorias: senescência replicativa, associada ao encurtamento dos telômeros, devido aos numerosos ciclos de divisão celular, e senescência induzida por estresse, que ocorre de maneira mais rápida em resposta a um estressor como estresse oxidativo, fumaça de cigarro e radiação (Serino; Salazar, 2018).

Harman foi um dos primeiros a propor que o processo de envelhecimento estaria correlacionado aos radicais livres produzidos no metabolismo aeróbico (Harman, 1956). Aliado a isso diversas patologias observadas no envelhecimento podem ser atribuídas ao acúmulo de produtos decorrentes do dano oxidativo em macromoléculas biológicas (Saldmann et al., 2019). Dados da literatura demonstram que há uma propensão ao aparecimento de condições patológicas como síndrome metabólica, câncer, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas com o avançar da idade. Sendo que tais condições listadas estão fortemente correlacionadas com o aumento dos níveis de espécie reativa de oxigênio (Forni et al., 2019; Saldmann et al., 2019; Vatner et al., 2020). O estresse oxidativo é considerado um dos principais mecanismos limitadores da longevidade em geral (Vatner et al., 2020). O estado de estresse oxidativo crônico observado no processo de envelhecimento

está atrelado à redução da defesa antioxidante e aumento de compostos oxidantes (Cabello-Verrugio et al., 2017; De la fuente; Gimenez-Llort, 2010), resultando em um declínio tanto na saúde física como em habilidades cognitivas, onde alterações cardiovasculares e a redução da memória caracterizam-se como mudanças notáveis (Cechella et al., 2018; Kreuz; Franco, 2017).

Diante do exposto, surgiram as primeiras hipóteses de que a administração dietética de antioxidantes poderia aumentar a longevidade (Harman, 1976), e desde então estudos têm sido realizados nesse sentido, com considerável ênfase em encontrar novas estratégias terapêuticas para diminuir o dano oxidativo (Cabello- verrugio et al., 2017).

Atualmente a atenção dos pesquisadores tem se voltado para efeitos de compostos bioativos nutracêuticos como polifenóis na prevenção de doenças relacionadas com estresse oxidativo, podendo citar as cardiovasculares, oncológicas e relacionadas ao envelhecimento (Furlan; Rodrigues, 2016). Nesse contexto, o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE), cujos estudos prévios do nosso grupo já demonstraram ação antioxidante (Da Costa et al., 2012; Rocha et al., 2008), torna-se uma atraente estratégia para o combate de doenças relacionadas ao desbalanço oxidativo e conseqüentemente proporcionar um envelhecimento mais saudável.

Outra estratégia de grande importância para a promoção da saúde de pessoas da terceira idade é a prática regular de atividade física aeróbica uma vez que exerce efeitos benéficos na prevenção de doenças relacionadas ao envelhecimento (Civinski; Montibeller, 2011). O exercício físico modula o equilíbrio redox através do aumento da defesa antioxidante (De Sousa et al., 2017), além de proporcionar benefícios cardiovasculares, psicológicos e sociais (Schweitzer et al., 2010).

### **Envelhecimento e comprometimento cognitivo.**

O declínio cognitivo é um processo natural e gradual que ocorre normalmente com o avançar da idade, mesmo na ausência de doenças neurodegenerativas, porém de modo que não interfere substancialmente com as atividades diárias do indivíduo (Khan et al., 2014).

O comprometimento cognitivo leve (CCL) é um estágio intermediário que se encontra entre a cognição considerada normal e a demência (Sanford, 2017). As funções cognitivas que exigem um maior grau de velocidade do processamento, como

resolução de problemas, função inibitória, memória de trabalho e memória de longo prazo são as mais afetadas por tal comprometimento com o avançar da idade (Khan et al., 2014; Sanford, 2017).

Do ponto de vista anatomopatológico, o cérebro de um idoso apresenta redução de volume, de modo irregular, com as regiões hipocâmpais de grande relevância para a memória, e os lobos frontais, responsáveis pelas funções executivas, com um maior grau de perda de células neuronais (Clemente; Ribeiro-Filho, 2008). Os principais substratos neuropatológicos que estão presentes na progressão do CCL para a doença de Alzheimer são as placas  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) e os emaranhados neurofibrilares de proteína Tau intracelular (ENF) (Tiwari et al., 2019). A formação de placas amiloides tóxicas a partir de peptídios, devido ao processamento anormal da proteína precursora amiloide (PPA), em formas tóxicas de peptídios beta-amiloide é uma das principais teorias para explicar a base biológica da doença de Alzheimer (Tiwari et al., 2019). Estas placas são estruturas extracelulares constituídas principalmente por acúmulo de depósito de peptídeos beta-amiloide. Sua presença pode gerar respostas inflamatórias, ativação da micróglia e dos astrócitos e liberação de substâncias químicas tóxicas, como citocinas e radicais livres (Ricciarelli; Fedele, 2017). As placas amilóides e os eventos químicos provocados por ela podem levar a ativação de cinases ocorrendo a fosforilação de proteínas Tau, responsáveis por estabilizar os microtúbulos, ocasionando a formação de emaranhados neurofibrilares (ENF). Todos esses eventos culminam com a morte neuronal (Clemente; Ribeiro-Filho, 2008). Apesar disso, pequenas quantidades de placas beta-amiloide e ENF encontradas no processo normal do envelhecimento, não têm em si significado patológico (Clemente; Ribeiro-filho, 2008; Ricciarelli; Fedele, 2017), podendo estar associadas a processo de declínio cognitivo normal devido a idade (Ricciarelli; Fedele, 2017; Tiwari et al., 2019). Contudo, estas alterações também se manifestam como uma etapa inicial da doença de Alzheimer em sua fase assintomática (Tiwari et al., 2019).

Ainda neste contexto, diversos fatores de risco modificáveis estão associados com a patologia, dentre eles destacam-se: a inatividade física, a depressão, o diabetes mellitus tipo 2 e as doenças cardiovasculares (McGurran et al., 2019). Investigações adicionais sobre essas vias podem contribuir para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Evidências sugerem que placas  $A\beta$  reduzem os níveis do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), principalmente pela redução da

proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) (Simi, 2011). CREB é um fator de transcrição importante para regulação de BDNF e formação de novas memórias. Os níveis cerebrais ou séricos de BDNF são considerados marcadores benéficos para a condição cognitiva (Amidfar et al., 2020; Simi, 2011). Além disso, a participação da transcrição mediada pelo CREB tem sido amplamente analisada no processo de memória e no desenvolvimento da doença de Alzheimer (Amidfar et al., 2020). A concepção de abordagens terapêuticas farmacológicas ou genéticas com ênfase na sinalização CREB-BDNF possui um potencial de tratamento promissor para o Alzheimer (Amidfar et al., 2020).

No momento, há poucos tratamentos farmacológicos comprovados para retardar a progressão do CCL para demência. Recentemente o *Food and Drug Administration* (FDA), uma agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, aprovou o uso do aducanumab, um anticorpo monoclonal humano que se liga seletivamente a fibrilas  $\beta$ -amilóides e oligômeros solúveis, para o tratamento da Doença de Alzheimer em fase de comprometimento cognitivo leve e demência leve (Fillit; Green, 2021; Schneider, 2020). Apesar da relevância desta autorização, até o presente momento, a comunidade científica têm questionado sobre a precocidade da aprovação, uma vez que não teria recebido experimentos suficientes (Fillit; Green, 2021; SBBG, 2021). Entretanto, há robustas evidências de que modificações no estilo de vida, incluindo dieta, exercícios e estimulação cognitiva, podem ser terapias não-farmacológicas eficazes no combate ao declínio cognitivo (Sanford, 2017).

### **Envelhecimento vascular e disfunção endotelial.**

Envelhecer pode ser considerado um fator de risco para a homeostase cardiovascular (Kovacic et al., 2011), estando fortemente atrelado com mudanças na estrutura e na função dos vasos, principalmente, nas grandes artérias (Maloberti et al., 2019; Seals; Alexander, 2018). Contudo, tais alterações também são observadas no leito vascular periférico (Mikael et al., 2017). Do ponto de vista histológico esse processo promove alterações morfológicas que incluem espessamento da parede vascular, aumento da deposição de colágeno e redução da elastina (Maloberti et al., 2019). Tais alterações promovem a diminuição da elasticidade do tecido conjuntivo vascular causando rigidez arterial e conseqüente aumento da resistência vascular

periférica em indivíduos idosos (Maloberti et al., 2019), o que contribui para as modificações da pressão arterial observadas com o avançar da idade. O envelhecimento arterial produz um aumento típico da pressão arterial sistólica (PAS), muitas vezes, de maneira isolada (Battistoni et al., 2020).

Um dos fatores que correlaciona o envelhecimento com o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares é o processo de disfunção endotelial (Han et al., 2018). O endotélio é um dos mais importantes reguladores da manutenção da homeostase vascular, estando envolvido em muitas funções fisiológicas, incluindo a regulação da pressão sanguínea, a promoção da angiogênese e o controle do processo de coagulação (Tesauro et al., 2017). O tônus vascular é regulado por moléculas secretadas pelo endotélio que atuam de maneira autócrina e parácrina (Gradinaru et al., 2015). Entre tais moléculas secretadas, destaca-se o óxido nítrico (ON) como um dos mais importantes mediadores da função vascular, devido a sua potente ação vasodilatadora (Michel e Vanhoutte. 2010). O ON é sintetizado pela enzima sintase do óxido nítrico endotelial (eNOS), possuindo um papel central na proteção do endotélio contra doenças cardiovasculares (Michel e Vanhoutte. 2010). O aumento da atividade da eNOS ocorre por meio da fosforilação de proteínas envolvidas na sua cascata de ativação como fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), Akt/proteína cinase B (AKT), proteína cinase A (PKA) e a proteína cinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK), nos resíduos serina 1177, 635 e 617 (Zhang et al. 2009). Uma eventual redução da biodisponibilidade de ON pode ser considerada como marcador de um endotélio disfuncional (Tesauro et al., 2017). A homeostase do endotélio vascular depende do balanço entre moléculas pró e antioxidantes, vasodilatadores e vasoconstritores, pró e anti-inflamatórios e pró e antitrombóticos (Gradinaru et al., 2015). Sendo a disfunção endotelial caracterizada pelo desbalanço favorecendo moléculas pró-oxidantes, vasoconstritoras, pró-inflamatórias e protrombóticas (Gradinaru et al., 2015)

Dentre os eventos patológicos de maior relevância para a disfunção endotelial destacam-se, o processo inflamatório e o estresse oxidativo (Tesauro et al., 2017). A disfunção endotelial também está relacionada ao processo de desacoplamento da enzima eNOS, que consiste na mudança da geração de ON para a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o ânion superóxido, por parte da enzima (Siragusa; Fleming, 2016). A geração excessiva de tal espécie pode inibir a atividade da própria eNOS, assim como inativar o ON produzido, contribuindo para uma menor

biodisponibilidade do agente vasodilatador, com consequente geração de peroxinitrito (Han et al., 2018).

O envelhecimento cardiovascular promove uma redução da função endotelial caracterizada, em parte, pela diminuição da resposta vasodilatadora dependente do endotélio, não só em artérias centrais como também em artérias periféricas (Barton et al., 1997). A microcirculação está presente em todos os tecidos do corpo, possuindo uma capacidade única de influenciar o ambiente local da maioria dos órgãos e tecidos alvos (Ungvari et al., 2018). Sendo assim, alterações funcionais e estruturais induzidas pelo envelhecimento na microcirculação contribuem para a patogênese de diversas doenças relacionadas com a idade, incluindo comprometimento cognitivo vascular, doença de Alzheimer, sarcopenia, doenças cardiovasculares, doenças renais e oculares (Ungvari et al., 2018).

Um dos métodos mais comumente utilizados para observar o grau de disfunção endotelial é através da reatividade vascular para um agente químico, geralmente acetilcolina, que produz uma resposta vasodilatadora dependente de endotélio para diversos tecidos vasculares (Furchgott E Zawadzki, 1980; Seals; alexander, 2018). A acetilcolina é um agonista dos receptores muscarínicos (M3) presentes nas células endoteliais. A ativação de tal receptor gera uma cascata de eventos que induzem a ativação da eNOS. A enzima por sua vez converte L-arginina em ON que rapidamente se difunde para a musculatura lisa vascular promovendo o seu relaxamento (Seals; Alexander, 2018). O declínio da função endotelial contribui para um risco aumentado de doença cardiovascular em adultos mais velhos e pode reduzir o fluxo sanguíneo muscular (Trott, 2009). Mudanças no estilo de vida que envolvam estratégias nutricionais e práticas de atividade física regular e moderada podem exercer um efeito protetor sobre doenças cardiovasculares e neurodegenerativas ocasionadas pelo envelhecimento (Klímová; Vališ, 2018).

### **Envelhecimento e Atividade Física**

A OMS recomenda uma prática de 150 minutos por semana de exercício físico aeróbico moderado, aliado a atividades de fortalecimento muscular, três ou mais vezes durante a semana para a população acima de 65 anos (WHO, 2020). O exercício físico aeróbico e regular está fortemente relacionado com a redução do risco

de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em idosos (Seals; Nagy; Moreau, 2019).

Do ponto de vista vascular, a atividade física poderia, em parte, reduzir a rigidez das grandes artérias induzida pelo envelhecimento (Jakovljevic, 2018), assim como promover uma melhora na disfunção endotelial induzida pela idade (Jakovljevic, 2018). Contudo, a intensidade, duração e frequência da atividade física aeróbica necessária para promover essas mudanças ainda não foram bem estabelecidas (Seals; Nagy; Moreau, 2019). É sabido que o exercício promove melhora na capacidade vasodilatadora dependente de endotélio, principalmente, devido ao aumento da produção e biodisponibilidade do ON (Seals; Nagy; Moreau, 2019), sendo esse um dos prováveis mecanismos para a melhora na disfunção endotelial (Rossman et al., 2018).

Além disso, a atividade física regular consiste em uma excelente ferramenta não farmacológica para a prevenção ou retardo do declínio cognitivo e conseqüentemente da doença de Alzheimer e da demência (Barnes, 2015; Duzel; Van Praag; Sendtner, 2016). Pode atuar tanto de forma indireta, pois modifica a prevalência de doenças (incluindo diabetes, hipertensão e depressão) consideradas como fatores de risco para o desenvolvimento da doença de Alzheimer (Barnes, 2015), quanto de forma direta onde os possíveis mecanismos envolvidos incluem: redução dos níveis de estresse oxidativo, através do aumento da defesa antioxidante endógena; redução dos níveis de moléculas pró – inflamatórias, atenuando a inflamação crônica induzida pela idade, e efeito neuroprotetor sobre o hipocampo atuando diretamente sobre as proteínas beta-amilóide e a Tau (Cechella et al., 2018).

Com o avançar da idade o músculo esquelético sofre uma perda gradual de massa, tamanho e função, chamada sarcopenia, que possui uma etiologia complexa e a participação de diversos fatores (Kim; Triolo; Hood, 2017). As mitocôndrias desempenham um papel fundamental na deterioração muscular relacionada ao envelhecimento, pois participam da produção de energia e espécies reativas de oxigênio (ERO), sinalização apoptótica e manipulação de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) (Kim; Triolo; Hood, 2017). Assim, o processo natural de envelhecimento, juntamente com a inatividade física coincidente, prejudica progressivamente a integridade mitocondrial, o que pode ser um dos principais fatores para a sarcopenia (Kim; Triolo; Hood, 2017).

O exercício é uma das principais estratégias conhecidas para combater a sarcopenia e isso é amplamente mediado por melhoras na plasticidade mitocondrial

(Joseph; Adihetty; Leeuwenburgh, 2016). A prática de exercício físico também pode melhorar o desempenho neuromuscular e funcional de idosos fazendo um importante balanço entre os fatores oxidativos e a capacidade antioxidante sendo considerado uma intervenção eficaz para melhorar a função mitocondrial em idosos saudáveis, reduzindo os efeitos adversos do processo de envelhecimento (Hooshmand-Moghadam et al., 2020). Tem sido atribuído ao coativador-1 alfa do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PGC-1 $\alpha$ ) um papel fundamental na regulação da biogênese mitocondrial no músculo esquelético em resposta a atividade física, por isso, é amplamente utilizado como um marcador da adaptação do músculo ao exercício físico, desempenhando um papel significativo nas alterações fenotípicas musculares e no desempenho aeróbio (Kim; Triolo; Hood, 2017). Por sua vez, a PGC-1 $\alpha$  pode ser ativada por meio de fosforilação pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Hood et al., 2016) ou desacetilação através da Sirtuína-1 (SIRT-1) (Tang, 2016). Este achado tem aumentado o interesse no desenvolvimento de fármacos que tenham como alvo a via SIRT1- PGC-1 $\alpha$ , para mimetizar ou potencializar os efeitos do exercício físico para o tratamento de doenças cardiometabólicas (Rasbach; Schnellmann, 2008).

A intervenção nutricional é outra ferramenta além da atividade física que vem ganhando notoriedade contra doenças ocasionadas pelo envelhecimento (Klímová; Vališ, 2018). Esta abordagem geralmente é bem tolerada, de baixo custo e segura a longo prazo em comparação com o tratamento farmacológico (Klímová; Vališ, 2018).

## **Envelhecimento e polifenóis**

Os polifenóis são encontrados principalmente em comidas e bebidas derivadas de plantas, fornecendo cor e sabor, além de exercer um papel de defesa contra o estresse provocado por radiação ultravioleta, patógenos e danos físicos. Sua estrutura varia de fenóis simples até moléculas complexas com alto nível de polimerização (Andriantsitohaina et al., 2012). Podem ser divididos em fenóis simples, flavonoides e não flavonoides. Como exemplos de polifenóis não flavonoides podemos citar o estilbeno (resveratrol), a saponina, a curcumina e os taninos. Já os flavonoides podem ser subdivididos em flavanóis (catequina e epicatequina), flavonóis (quercetina e

miricetina), antocianinas (cianidina e delphinidina), flavonas (naringenina e hesperetina) e chalconas (floreína) (Andriantsitohaina et al., 2012).

Evidências sugerem que uma dieta contínua e prolongada rica em polifenóis, poderia ajudar na prevenção de diversas patologias degenerativas, tais como diabetes, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Fernando et al., 2017). Nesse contexto, os efeitos deletérios da idade relacionados ao comportamento e a função cerebral podem ser retardados ou mesmo revertidos com o aumento dos níveis de antioxidantes, anti-inflamatórios ou o sinergismo destes (Carey et al., 2017). Estudos sugerem uma relação positiva entre a suplementação com polifenóis e a melhora cognitiva em modelos animais. Compostos polifenólicos poderiam exercer uma ação direta no sistema nervoso central, sendo uma possível fonte de estimulantes de fatores neurotróficos (Hosseini et al., 2018). A ativação das vias BDNF /CREB (responsável pelo aprendizado, memória e plasticidade neural), assim como a via do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf-2), um dos principais envolvidos na transcrição de genes que codificam enzimas antioxidantes, atuando também na modulação de respostas inflamatórias e imunes, representam mecanismos pelos quais muitos polifenóis exercem sua ação neurotrófica (Hosseini et al., 2018). Compostos como as antocianinas presentes no açaí são capazes de combater alguns dos efeitos inflamatórios e oxidativos mediadores do envelhecimento no nível celular (Poulose et al., 2012). De maneira semelhante, proantocianinas derivadas da semente da uva promoveram melhora na cognição e na memória espacial de camundongos com Alzheimer (Lian et al., 2016). O mesmo foi observado na suplementação com dieta de blueberry no qual aprimorou a memória espacial e de trabalho devido ao aumento dos níveis de BDNF e CREB no hipocampo (Rendeiro et al., 2012; Williams et al., 2008).

Estudos da literatura também reforçam o impacto dos polifenóis na melhora dos distúrbios cardiovasculares e do envelhecimento através de sua ação neutralizadora de ERO, cuja ação é implicada na apoptose e senescência de diversas células do sistema cardiovascular (Khurana et al., 2013). O resveratrol, um dos principais polifenóis encontrados no vinho, possui propriedades na longevidade, com efeitos cardioprotetores e contra o câncer, que são atribuídos a mitigação do estresse oxidativo (Csiszar, 2011).

Diversos estudos também demonstram um positivo sinergismo entre polifenóis e a prática de atividade física (Hart et al., 2013, de Bem et al. 2018).

Epicatequina, sozinha ou associada ao exercício, aumenta a resistência à fadiga muscular e a capacidade oxidativa em músculo esquelético de ratos (Nogueira et al., 2011). Outra evidência sugere que a associação de epicatequina e exercício físico foi capaz de atenuar o déficit de memória em modelo animal de Alzheimer (Walker et al., 2015). Um flavonóide natural como a quercetina pode desempenhar efeito ergogênico em ratos que praticam atividade física (Casuso et al., 2013). Um estudo com resveratrol demonstrou sua capacidade de melhorar a resistência e a performance física de ratos promovendo a biogênese mitocondrial (Hart et al., 2013). Os polifenóis também aumentam a produção de ON no endotélio, via eNOS, melhorando o fluxo sanguíneo (Bailey et al., 2009; Li et al., 2019).

Sendo assim, somam-se diversas evidências sugerindo que a suplementação com polifenóis juntamente com a prática da atividade física podem auxiliar no declínio cognitivo e na prevenção de doenças cardiovasculares oriundas do envelhecimento.

### **Extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE).**

A *Palmácea* da família *Aracaceae*, popularmente conhecida como açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma planta importante no agronegócio da região Amazônica para extração da polpa de frutos e palmito (Figura 1), sendo amplamente encontrada, nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá. A casca do fruto do açaí é comumente usada para fazer suco, sorvete, doces e é muito consumida no Brasil, especialmente no Pará (300.000 toneladas), região sudeste (650 toneladas) e demais regiões (200 toneladas) (CONAB, 2019). Em 2019, cerca de 4.000 toneladas dos frutos foram exportadas pelo Pará, principalmente para os Estados Unidos (70%), além de países europeus como Alemanha, Bélgica, Holanda e Japão (CONAB, 2019). Entretanto, grande parte do açaí que chega ao estado de São Paulo, oriundo do Pará é beneficiado e exportado pelo estado, o que o torna o maior exportador da polpa do fruto (CONAB, 2019).

Figura 1 - Foto ilustrativa da *Euterpe oleracea* Mart. (açai)



*Euterpe oleracea* Mart.  
(Palmácea conhecida como açazeiro)

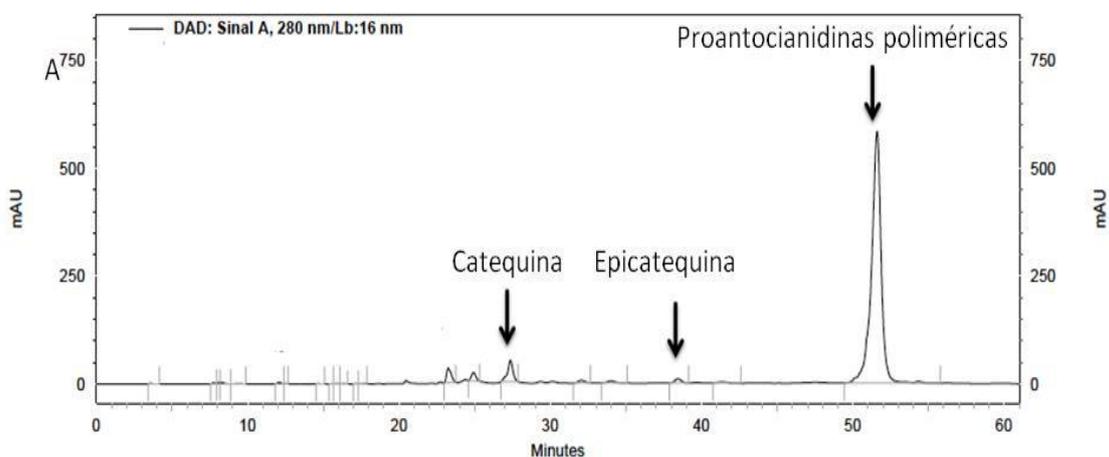
Legenda: Palmácea da *Euterpe oleracea* Mart (açai).  
Fonte: Edson Grandisoli.

Na medicina popular, a polpa do açai é utilizada para o tratamento da diarreia (Flor & Barbora, 2015), em casos de febre, dor e inflamação (Matheus et al., 2006; Moura e Resende, 2015), principalmente entre pessoas das regiões norte e nordeste.

Estudos químicos demonstram que a polpa do açai é rico em polifenóis como epicatequina, catequina e antocianinas (cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-rutinosídeo), entre outros (Bobbio et al., 2000), e que devem ser responsáveis pelos já citados efeitos benéficos (Portinho et al., 2012; Andriantsitohaina et al., 2012).

Estudos pioneiros realizados pelo nosso grupo demonstraram que o extrato hidroalcolico do caroço do açai (ASE), uma parte habitualmente negligenciada e descartada do fruto é rico em catequina, epicatequina e proantocianidinas poliméricas (de Oliveira et al., 2015) (figura 2), apresentando conteúdo polifenólico mais expressivo que a polpa, e ainda uma ação vasodilatadora mais intensa do que a obtida com o extrato da polpa de açai (Rocha et al. 2007).

Figura 2 - Perfil de eluição obtido por cromatografia líquida do extrato hidroalcoólico do caroço do açaí



Nota: Análise por HPLC do ASE. Os picos marcados a 27, 38 e 51 minutos correspondem a catequina, epicatequina e proantocianidinas poliméricas respectivamente, como confirmado por injeção de padrões e por comparação do espectro de absorção no ultravioleta. Mais evidências sobre a estrutura dos compostos presentes no ASE foram fornecidos por espectrometria de massa positiva modo de electrospray.

Fonte: de Oliveira et al., 2015.

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o ASE, cujo processo de obtenção e indicações terapêuticas já foram depositadas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), assim como, no Patent Cooperative Treaty (PCT), induz um efeito vasodilatador dependente do endotélio (Rocha et al., 2007), ação antioxidante (Da Costa et al., 2012; Rocha et al., 2008), protetora contra os danos causados pela disfunção endotelial, obesidade, e diabetes mellitus tipo 1 e 2 (Cordeiro et al., 2017; Da Costa et al., 2012; De Bem et al., 2018; De Oliveira et al., 2010; Tavares et al., 2020). Além disso, conta com propriedades anti-inflamatórias (Cordeiro et al., 2017; Moura et al., 2012), hipolipidêmica (De Oliveira et al., 2010, 2015) e hipoglicemiante (de Bem et al., 2017; De Bem et al., 2018). Estes achados demonstram um efeito benéfico do extrato ASE, como uma planta medicinal, apresentando grande potencial no tratamento de doenças cardiovasculares e metabólicas.

A ação vasodilatadora dependente de endotélio do ASE mostrou ser, em parte, mediada pela produção e liberação do ON nas células endoteliais e pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (Rocha et al., 2007). Também foi

demonstrado que o efeito vasodilatador dependente de ON do ASE teria a participação da guanilato ciclase solúvel (Murad et al., 1988) e também da ativação de canais de K<sup>+</sup> (Tare, 1990), independente da liberação de prostanoídes (Rocha et al., 2007). Aliado a isso, demonstramos recentemente que o extrato melhora o desempenho físico, reduzindo os níveis de dano oxidativo e ativando as proteínas chaves da biogênese mitocondrial em animais adultos saudáveis (De Andrade Soares et al., 2020).

Com base nesses achados e nas propriedades do ASE já descritas, assim como, nas evidências de que tanto a atividade física como a suplementação com antioxidantes podem reduzir o risco cardiovascular e promover um efeito neuroprotetor, no presente estudo investigamos os efeitos do ASE e do exercício físico na memória e no aprendizado, na função vascular e no desempenho físico em animais idosos.

## 1. OBJETIVO

### 1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do tratamento com ASE na disfunção vascular, no desempenho físico e na memória de ratos idosos submetidos ao exercício físico moderado com o objetivo de identificar potenciais benefícios cardiovasculares e neuroprotetores, assim como uma possível interação positiva do ASE e exercício.

### 1.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito do tratamento com ASE em ratos wistar idosos submetidos à prática regular de exercício sobre:

- a) O peso, os níveis de ácido lático e glicose;
- b) O desempenho físico através do teste de esforço máximo;
- c) A pressão arterial e a reatividade vascular em leito arterial mesentérico (LAM) e anel de aorta de rato;
- d) A expressão de marcadores de função vascular (PI3K, AKT e eNOS) em leito arterial mesentérico e aorta;
- e) A morfologia da artéria aorta;
- f) A expressão de marcadores da biogênese mitocondrial (AMPK, SIRT-1 e PGC-1 $\alpha$ ) no músculo esquelético;
- g) A memória e o aprendizado através do teste de esquiva passiva inibitória;
- h) A expressão de marcadores da memória e aprendizado (BDNF e CREB) no hipocampo;
- i) Os níveis de ON, dano oxidativo e atividade enzimática na aorta, no músculo esquelético e no hipocampo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais utilizados e modelo experimental

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (Nº CEUA/038/2017). Para este estudo foram utilizados 80 ratos wistar (350-450g) machos provenientes de 30 ninhadas, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia/ IBRAG/UERJ. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, em ambiente com temperatura média de ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade ( $60 \pm 10\%$ ) controladas. O ciclo claro-escuro foi de 12 h, com presença de luz a partir das 6:00 h da manhã.

Para realização do estudo foram formados 5 grupos experimentais, sendo eles:

a) Controle jovem (n=16): Animais jovens (3 meses) que receberam dieta padrão para ratos e foram submetidos ao teste de esquiva passiva inibitória ao final das 4 semanas de experimento;

b) Controle idoso (n=16): Animais idosos (18 meses) que receberam dieta padrão para ratos e foram submetidos ao teste de esquiva passiva inibitória ao final das 4 semanas de experimento;

c) Idoso + ASE (n=15): Animais idosos (18 meses) que receberam dieta padrão para ratos e 200 mg/kg/dia de ASE por gavagem intragástrica, durante 4 semanas. Ao final desse período foram submetidos ao teste de esquiva passiva inibitória;

d) Idoso + Treino (n=17): Animais idosos (18 meses) que receberam dieta padrão para ratos e realizaram o treinamento físico aeróbico crônico durante 4 semanas. Ao final deste período foram submetidos aos testes de esforço máximo e de esquiva passiva inibitória;

e) Idoso + Treino + ASE (n=16): Animais idosos (18 meses) que receberam dieta padrão para ratos e 200 mg/kg/dia de ASE por gavagem intragástrica e realizaram o treinamento físico aeróbico crônico durante 4 semanas. Ao final deste período foram submetidos aos testes de esforço máximo e de esquiva passiva inibitória.

Os animais não tratados com o ASE receberam água por gavagem intragástrica diariamente para mimetizar as mesmas circunstâncias de estresse dos animais tratados. O peso corporal dos animais foi mensurado duas vezes por semana, por meio de balança digital.

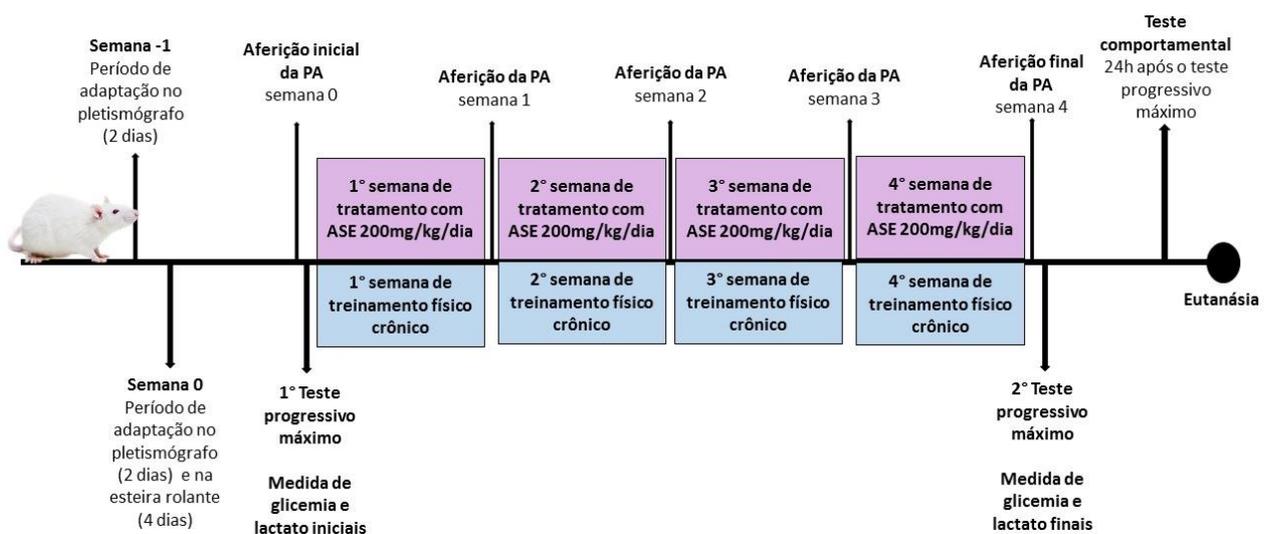
## 2.2 Preparo do extrato hidroalcoólico do caroço de açaí

Utilizamos frutos da planta *Euterpe oleracea* Mart. (açaí), provenientes de Belém, fornecidos pelo nosso colaborador Professor Dr. Pergentino José Cunha Souza, docente da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará. Após a lavagem dos frutos, aproximadamente 200 g de caroço foram separados, triturados, embebidos em 400 mL de água destilada, e então fervidos por cinco minutos. Imediatamente após a fervura acrescentou-se 400 mL de etanol. O extrato hidroalcoólico foi guardado em geladeira e agitado periodicamente por 2 a 4 h ao longo de 10 dias. Ao final deste período, o extrato foi filtrado em papel de filtro comum e depois em papel de filtro tipo Whatman número 1. Posteriormente, todo o etanol foi evaporado à baixa pressão na temperatura de 50° a 60°C. O resíduo foi liofilizado e em seguida armazenado num frasco protegido contra à exposição luminosa até o seu uso (Rocha et al. 2007). Após o preparo de todos os extratos, o conteúdo de polifenóis foi medido pelo método colorimétrico determinado por Singleton (1965), usando o reagente Folin Ciocalteu, assim como o seu potencial efeito vasodilator verificado através da reatividade vascular. Essas medidas são utilizadas como controle de qualidade e viabilidade do extrato para a posterior utilização. A dose tóxica de administração do ASE é a partir de 1,5 g/kg (dados não publicados).

### 2.3 Protocolo de treinamento físico

Antes do início do treinamento físico aeróbico em esteira rolante os 40 animais dos grupos Idoso + Treino e Idoso + Treino + ASE foram submetidos a um teste progressivo máximo para a determinação da intensidade de treinamento (teste de esforço). O teste consistiu em um protocolo de exercício físico escalonado em esteira rolante, com velocidade inicial de 3m/min, incrementada de 4m/min a cada três minutos até a exaustão do animal, momento em que não é mais mantido o padrão de corrida. Após a definição da velocidade pelo teste de esforço, o treinamento físico crônico foi realizado em esteira rolante durante quatro semanas, cinco vezes por semana, com duração de trinta minutos cada sessão. A velocidade do treinamento físico crônico foi progressivamente aumentada de 50% até 60% da velocidade máxima atingida durante o teste progressivo máximo, que corresponde a uma intensidade moderada de treinamento (Matsuura et al., 2010). O teste progressivo máximo foi repetido mais uma vez ao final das quatro semanas de tratamento para verificar as alterações no tempo e na distância percorrida, ocasionadas pelo treinamento físico crônico (Figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática do protocolo experimental



Fonte: O autor, 2021.

## 2.4 Dosagens séricas

### 2.4.1 Glicemia

A medida da glicemia de jejum foi realizada uma vez antes e outra após as quatro semanas de treinamento crônico. A medida foi realizada com os animais em jejum de doze horas, a partir de amostras de sangue coletadas da extremidade da cauda do animal e com o auxílio de um aparelho medidor automático para a determinação de glicose (Accutrend® Plus Roche).

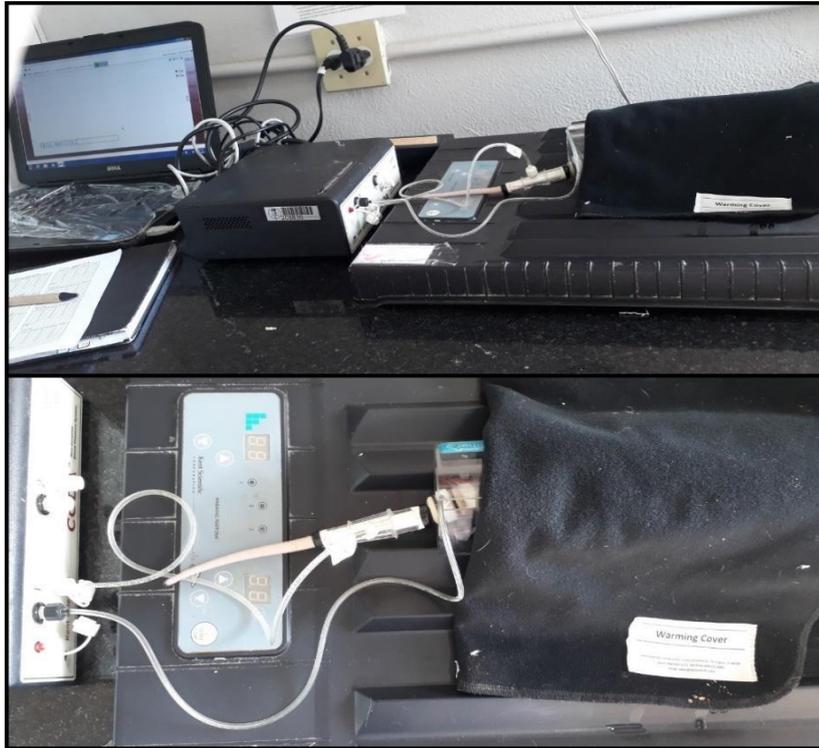
### 2.4.2 Lactato

A dosagem de lactato foi realizada duas vezes, uma imediatamente após o primeiro teste progressivo máximo e outra após o último, apenas dos animais submetidos ao treinamento físico. O lactato foi obtido a partir de amostras de sangue coletadas da extremidade da cauda do animal e com o auxílio de um aparelho monitor para a determinação de lactato (Accutrend® Plus Roche).

## 2.5 Medida da pressão arterial

A Pressão arterial sistólica (PAS) e a Pressão arterial diastólica (PAD) (mmHg) foram aferidas através da pletismografia de cauda, um método não invasivo, com o aparelho CODAHT2 (Kent Scientific). Nesse método, um garrote e um sensor de pulso são colocados em torno da cauda do animal e, através do volume de sangue que flui pela cauda, os dados de pressão são registrados (Figura 4). Antes do início do protocolo experimental, os animais passaram por dois dias de ambientação no aparelho. As medidas da PA foram realizadas semanalmente, durante as 4 semanas.

Figura 4 - Medida da PA pelo método da pletismografia de cauda



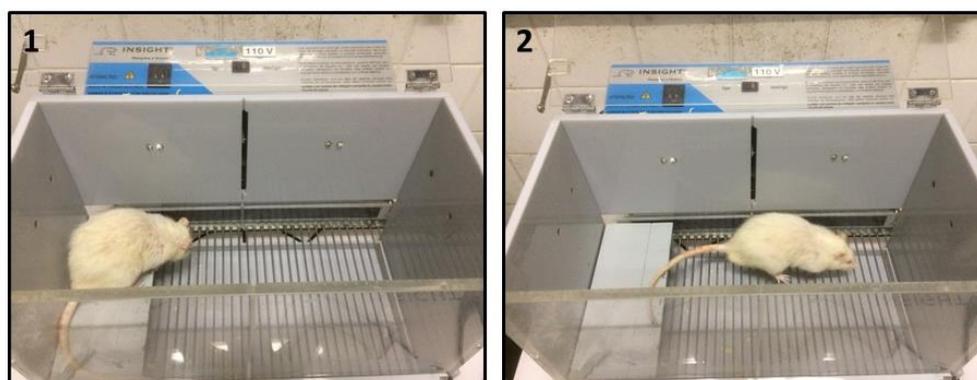
Fonte: O autor, 2021.

## 2.6 Teste de Esquiva Passiva Inibitória (EPI)

A EPI foi realizada em uma caixa com uma plataforma retangular, posicionada lateralmente sobre uma grade metálica (Insight, Caixa de Esquiva Ativa e Passiva EP 112). Os animais foram submetidos a três testes na EPI. No 1º teste, os animais foram individualmente colocados sobre a plataforma e, imediatamente após colocarem as quatro patas na grade metálica, receberam um choque de 0,4 mA durante 3 segundos (T1). Um segundo teste foi realizado 3 horas após o recebimento do estímulo aversivo (choque) no 1º teste e um último teste foi realizado 24 horas após o teste inicial. Os intervalos de avaliação utilizados foram necessários para avaliação de memória a curto (3 h) e longo (24 h) prazo (Forwood; Winters; Bussey, 2005; Winters et al., 2004). Em todos os 3 testes o tempo de latência para a descida da plataforma foi anotado. Duas variáveis foram utilizadas nas análises quantitativas: a latência de descida (como indicado acima) e a diferença entre as latências dos diferentes testes.

Foi atribuído um valor de corte para tempos menores que 5 segundos no 1º teste (T1). O valor máximo de tempo atribuído ao teste foi de 180 segundos. A esQUIVA inibitória tem sido amplamente utilizada para estudar o aprendizado e memórias de curto e longo prazo em roedores (Izquierdo et al., 2002).

Figura 5 - Teste de esQUIVA passiva inibitória



Legenda. Teste de esQUIVA passiva inibitória. (1) Animal sobre a plataforma. (2) Animal sobre a grade elétrica

Fonte: O autor, 2021.

## 2.7 Eutanásia e coleta de tecidos

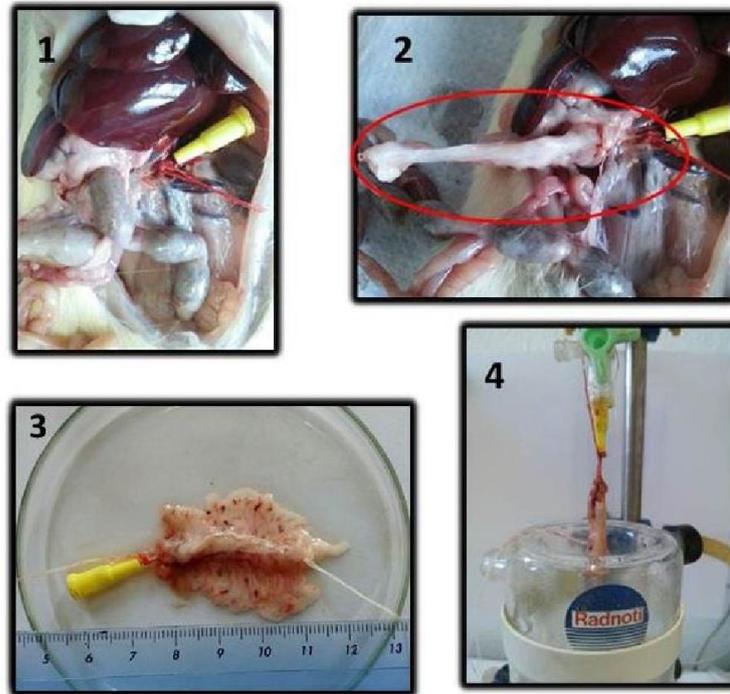
Ao final das 4 semanas de protocolo experimental os animais foram eutanasiados por decapitação para a coleta dos seguintes tecidos: aorta, leito arterial mesentérico (LAM), hipocampo, músculo *soleus* e gastrocnêmio. A aorta foi seccionada em duas partes, uma destinada a reatividade vascular à substâncias vasoativas e a outra para a morfologia, as demais amostras foram utilizadas para as análises de Western blotting, atividade enzimática, dosagem de nitrito e ensaio pró-oxidante. Uma parte das amostras de LAM foram destinadas a reatividade vascular à substâncias vasoativas e outra parte para as análises de Western blotting. As amostras de hipocampo e músculo *soleus* foram utilizadas para as análises de Western blotting, atividade enzimática, dosagem de nitrito e ensaio pró-oxidante. As

amostras do músculo gastrocnêmio foram destinadas ao estudo de microscopia eletrônica.

## **2.8 Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM)**

Após o período experimental, os ratos foram eutanasiados e em seguida submetidos a laparotomia. O LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umedecida com solução nutriente de Krebs modificada (g/L), NaCl 1 M, KCl 0,5 M, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,5 M, MgSO<sub>4</sub> 0,1 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, NaHCO<sub>3</sub> 1,86 g, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 1,42 g (Resende; Ballejo; Salgado, 1998). Os ramos pancreático-duodenal, íleocólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE 50; Clay-Adams), de aproximadamente 4 cm de comprimento, preenchida com solução de Krebs heparinizada. Em seguida, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs modificada.

Figura 6 - Isolamento do Leito arterial mesentérico



Legenda. Esquema de isolamento do leito arterial mesentérico (1). Artéria mesentérica sendo canulada (2). Isolamento do leito arterial mesentérico (3). Leito arterial mesentérico canulado e isolado (4). Leito arterial mesentérico no sistema de perfusão e medida da reatividade vascular.

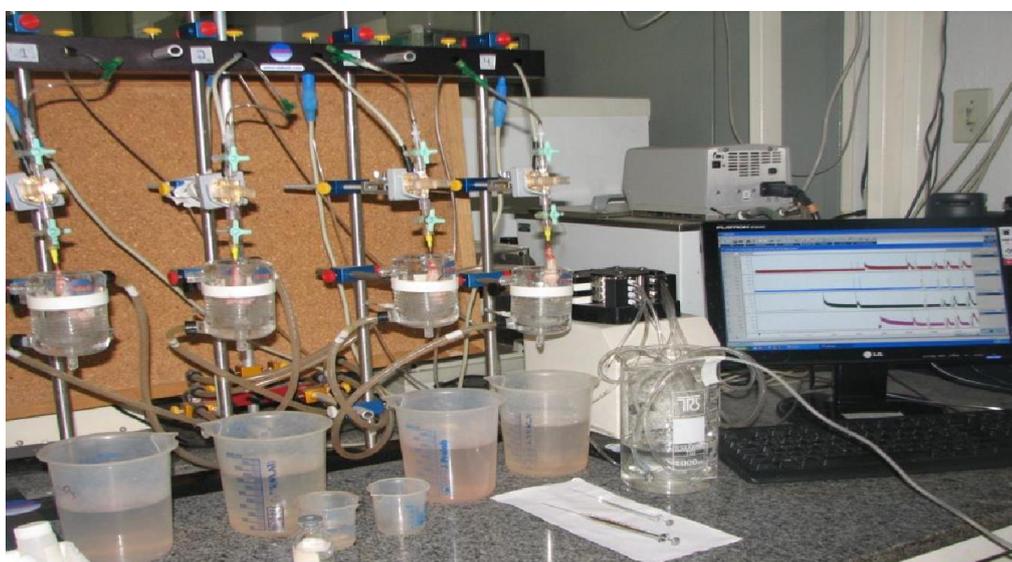
Fonte: O autor, 2021.

## 2.9 Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas

Após o isolamento, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10mL) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson®). A solução de Krebs, mantida à 37°C e aerada com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) foi infundida à velocidade constante de 4 mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa (PowerLab 4/30). Os experimentos foram precedidos de um período de trinta minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal foi

mantida entre 20 e 40 mm Hg (Resende; Ballejo; Salgado, 1998) e então foram administradas injeções de 120  $\mu$ mol de cloreto de potássio (KCl) de dez em dez minutos até obter uma resposta consistente. Em seguida, iniciou-se a pré-contração do LAM, no qual a norepinefrina (NE) foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (30  $\mu$ M) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 80-100 mmHg.

Figura 7 - Foto do esquema de perfusão do leito arterial mesentérico



Legenda: Aparelho no qual é realizado o estudo da reatividade vascular em leito arterial mesentérico dos ratos.

Fonte: O autor, 2021.

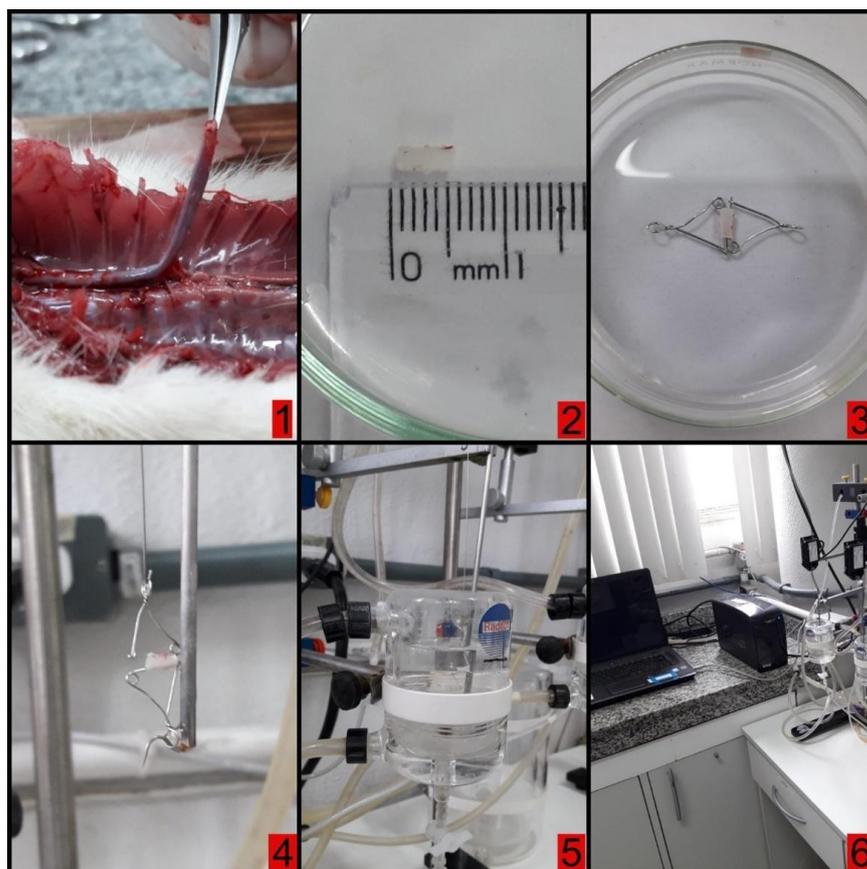
Logo após a obtenção de uma resposta pressora induzida pela NE, testamos a viabilidade do endotélio vascular, com a injeção de acetilcolina (ACh 0,01-300  $\mu$ mol), a qual produz um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de NO pelas células endoteliais. Em seguida, com o objetivo de avaliar a reatividade vascular a um agente vasoconstritor, a preparação vascular foi perfundida com solução de Krebs pura, ou seja sem NE, para que a pressão de perfusão voltasse aos níveis basais. Após um período de 10 minutos de estabilização foram realizadas curvas dose-resposta à NE (0,01-3000 nmol). A resposta aos agentes vasodilatadores foi expressa em termos de % de queda da resposta pressora induzida pela NE e a resposta pressora da NE foi expressa pelo % de contração subtraído da pressão basal. As

injeções “in bolus” das substâncias utilizadas nos experimentos foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de microseringas Hamilton de 10 e 100µl. O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente cinco minutos, permitindo sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores e as injeções foram administradas em volumes que variam de 5 a 50 µL.

## 2.10 Isolamento do anel de aorta

Para o estudo da reatividade vascular em vaso de condutância, os anéis de aorta foram isolados e preparados de acordo com (Furchgott e Zawadzki, 1980) e adaptado por Zanichelli et al., 2004. O tórax foi aberto por meio de uma incisão mediana, a porção torácica da aorta foi removida e dividida em dois anéis de aproximadamente 4 mm de comprimento cada. Cada anel foi posicionado entre 2 ganchos de aço inoxidável em forma de triângulo, conectados a um transdutor de força isométrica (Panlab S.I. TRI202P). Estes ganchos contendo o anel de aorta foram colocados individualmente em uma cuba contendo 40 mL de solução fisiológica de Krebs modificada (g/L), NaCl 1 M, KCl 0,5 M, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,5 M, MgSO<sub>4</sub> 0,1 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M, NaHCO<sub>3</sub> 1,86 g, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 1,42 g (Resende et al. 1997) e constantemente borbulhada com O<sub>2</sub> (95%) e CO<sub>2</sub> (5%). A temperatura do banho foi mantida em 37° °C.

Figura 8 - Esquema de isolamento e medida de tensão da aorta



Esquema de isolamento da artéria aorta. Artéria aorta sendo isolada (1). Corte e medida do anel de aortal (2). Montagem da aorta nos ganchos de aço inoxidável (3). Montagem da aorta no sistema de tensão (4). Aorta no sistema de tensão com cuba aquecida a 37°C e banhada em solução salina de Krebs (5) . Aparelho no qual é realizada a reatividade na artéria aorta (6).

Fonte: O autor, 2021.

### 2.11 Medida da reatividade do anel de aorta às substâncias vasoativas

Após a instalação do anel de aorta na cuba, os mesmos foram submetidos a uma tensão basal de 2g. Os anéis permaneceram por um período de 60 minutos para estabilização, durante os quais a solução de Krebs foi substituída a cada 20 minutos. Para registro das tensões desenvolvidas, utilizamos um transdutor isométrico de tensão (Panlab S.l. TRI202P), conectado a um sistema amplificador (ADInstruments, Quad bridge amp ML224). Os gráficos de tensão foram registrados através do programa de computador (PowerLab 4/30). Em seguida, foram obtidas curvas

concentração-efeito cumulativas à NE ( $10^{-10}$  mol/L–  $10^{-4}$  mol/L) e ACh ( $10^{-10}$  mol/L–  $10^{-4}$  mol/L); esta última com o anel pré-contraído com fenilénfrina (Phe), na concentração de  $3 \times 10^{-7}$  mol/L.

## 2.12 Morfologia da aorta

Metade da artéria aorta torácica foi isolada e fixada em paraformaldeído 4%, pH 7.4 e incluída em blocos de paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA). Cortes de  $3 \mu\text{m}$  foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análise da espessura da camada média do vaso. As imagens digitais foram capturadas (formato JPEG, colorida 36-bit, 1360-1024 pixels, objetiva de 20x para camada íntima-média) com uma câmera LC Evolution e um microscópio de luz Olympus BX51 e as análises foram realizadas com o programa Image-Pro Plus versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA).

## 2.13 Análise da expressão de proteínas por Western Blotting

O tecido muscular esquelético do músculo soleus, o hipocampo, a artéria aorta e o leito arterial mesentérico foram homogeneizados em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Triton x100 e SDS 0,1%, pH 7.4) com 1  $\mu\text{l}$  de coquetel de inibidores de proteases (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablet, EDTA free, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), dez vezes o volume do seu peso, centrifugados (13000 rpm, 4°C por 25 min) e sonificado por 5 segundos. A concentração proteica foi determinada usando ensaio colorimétrico do kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific Inc., Barrington, IL, EUA), seguindo as recomendações do fabricante e a leitura foi realizada a 540 nm. As amostras foram desnaturadas em tampão de amostras (Tris-HCl 50 mM, pH: 6,8, 1% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,001% azul de bromofenol) e aquecidas a 95°C por 5 min. As amostras foram analisadas em condição desnaturante por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foram aplicados 20

µg de proteína dos homogenatos em poços no gel de 10% de poliacrilamida para eletro-separação de acordo com o tamanho e carga da proteína. Em seguida, as proteínas foram transferidas por eletroforese para membranas de nitrocelulose (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EUA). Para inibir ligações inespecíficas do anticorpo, as membranas foram incubadas (1½ h) em (Tween 20 + tris-buffered saline) T-TBS acrescido de albumina a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 90 min. Posteriormente, as membranas foram lavadas com T-TBS e incubadas com o anticorpos policlonais primários específicos para cada proteína (overnight, a 5°C): anti-AKT (1:1000); anti-pAKT (1:1000); anti- anti-PI3K (1:500); anti-eNOS ; anti-p-eNOS (s1177) em homogenato da artéria aorta e do leito arterial mesentérico onde o controle de normalização foi realizado através do anticorpo anti-β actina (1:1000); anti-PGC-1α (1:500); anti-AMPK (1:500); anti-pAMPK (1:500) e Anti-SIRT-1 (1:1000) em homogenato de tecido muscular esquelético que, por sua vez, o controle de normalização foi realizado através do anticorpo anti-β tubulina (1:1000); anti-CREB (1:1000) e anti-BDNF (1:1000) em homogenato do hipocampo, no qual o controle de normalização foi realizado com o anticorpo anti-GAPDH (1:500). Após este período de incubação, utilizamos um anticorpo secundário específico para cada anticorpo primário: anti-rabbit (1:1000) e (1:5000), anti-mouse (1:1000) e anti-goat (1:1000) (anticorpos da Santa Cruz Biotechnology Inc.; CA). Antes da revelação, todas as membranas foram lavadas três vezes com T-TBS por dez minutos a cada lavagem. A revelação foi realizada com o auxílio do reagente de detecção quimioluminescente altamente sensível (Amersham ECL Prime Western Blotting, GE Healthcare, UK). As imagens foram captadas usando o ChemiDoc XRS+ (BIORAD Inc; CA). As bandas foram analisadas quantitativamente por densitometria no software Adobe Photoshop CS6 (Adobe System Inc; CA).

## 2.14 Ensaios pró-oxidantes

### 2.14.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Este método é utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído-MDA), que são

substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico (TBA) formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microssomos. MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532 nm). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper e Hadley (1990) e adaptada para medida em plasma e homogenato de músculo soleus. Foram utilizados 200 µL de homogenato do tecido muscular esquelético, do hipocampo e da artéria aorta para 400 µL de ácido tricloroacético (TCA). As amostras foram centrifugadas por dez min em 1000 rpm à 4°C. Separou-se 500 µL do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionou 500 µL de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100°C) por trinta minutos. Deixou-se esfriar por cinco minutos e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

## 2.15 Atividade das enzimas antioxidantes

A medida da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) foi realizada em amostras de homogenato do tecido muscular esquelético, do hipocampo e da artéria aorta preparados com tampão fosfato (NaCl 5,84 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,8 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 26,8 g, KCl 7,45 g, EDTA 2,28 g) em pH:7,4.

### 2.15.1 Medida da superóxido dismutase

A enzima SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e oxigênio. A determinação da atividade da enzima baseou-se na medida da concentração de adenocromo, resultante da oxidação da noradrenalina pelo ânion superóxido. Este ensaio foi realizado utilizando a técnica descrita por Bannister; Calabrese, 1987 para a medida no plasma e homogenato de músculo esquelético. Foram utilizados 20, 40 e 60 µL de cada amostra de homogenato de tecido muscular esquelético em cubetas separadas, 5, 10 e 30 µL de cada amostra de

homogenato de hipocampo e 5, 15 e 25  $\mu\text{L}$  de cada amostra de homogenato da artéria aorta. As amostras foram incubadas com 970  $\mu\text{L}$  tampão glicina (3,75mg/mL de água destilada) e noradrenalina (19 mg/mL de água destilada). Também foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  da enzima catalase (1,2 mg/ml de água destilada) ao meio, para retirar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida espectrofotometricamente (480 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de cento e oitenta segundos.

### 2.15.2 Medida da catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formando oxigênio molecular e água. A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pela reação. Foram utilizados 20, 30 e 40  $\mu\text{L}$  de amostra de homogenato da artéria aorta, hipocampo e tecido muscular esquelético, respectivamente, em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato e  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0.16%). A concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi avaliada durante sessenta segundos por espectrofotometria (240 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de sessenta segundos (AEBI, 1984).

### 2.15.3 Medida da glutathione peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para  $\text{H}_2\text{O}$  e álcool, usando a GSH como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPx foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotometria, no comprimento de onda de 340 nm. Foram utilizados 8  $\mu\text{L}$  de homogenato da artéria aorta, 100 $\mu\text{L}$  de homogenato de hipocampo e 100 $\mu\text{L}$  de tecido muscular esquelético em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 1800  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato, glutathione reduzida (2

mM), GR (0.11 mg/mL) e azida sódica (0,065 mg/mL) durante dez minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas as leituras em um intervalo de cento e oitenta segundos. Posteriormente, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por duzentos e quarenta segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340 nm; Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por (Flohé e Gunzler, 1984) e adaptada para os tecidos estudados.

### **2.16 Dosagem de nitrito na aorta, hipocampo e tecido muscular esquelético.**

O ON possui um tempo de vida curto, por isso, a medida da produção do mesmo é mensurada pela formação do nitrito (NO<sub>2</sub>), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito pode ser realizada pelo método de Griess, no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto. O nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina formando um composto azo estável de coloração púrpura. 100ul de plasma e 50ul de homogenato de aorta foram adicionados em cada poço de uma placa de ELISA. Posteriormente, foram adicionados 20 ul, 25 ul e 40 ul para homogenato de hipocampo, aorta e tecido muscular esquelético respectivamente, da solução 1 (sulfanilamida 1% em solução de ácido fosfórico a 2,5% = 200 mg sulfanilamida + 600 µl de ácido fosfórico + 19,4 ml de H<sub>2</sub>O destilada). Após 10 minutos, foram adicionados 50ul para o plasma e 25 ul para aorta, da solução 2 (N-naftil-etilenodiamina 0,1% em solução de ácido fosfórico a 2,5% = 20 mg de N-naftil-etilenodiamina + 600 µl de ácido fosfórico + 19,4 ml de H<sub>2</sub>O) e analisado em comprimento de onda de 540 nm (Green et al., 1982).

### **2.17 Estudo de Microscopia Eletrônica**

Fragmentos do músculo gastrocnêmio foram fixados em glutaraldeído 2,5% em cacodilato 0,1 M, pH 7,4, e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%. As amostras foram

desidratadas através de uma série graduada de acetona e embebidas em resina Epon 812. Cortes ultrafinos (70 nm) foram feitos com ultramicrótomo Leica Ultracut UCT, coletados em grades de cobre, corados com acetato de uranila a 5% e citrato de chumbo. Os cortes foram examinados com microscópio eletrônico JEM1200EX (JEOL, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 80 kV.

### 2.18 **Análise estatística**

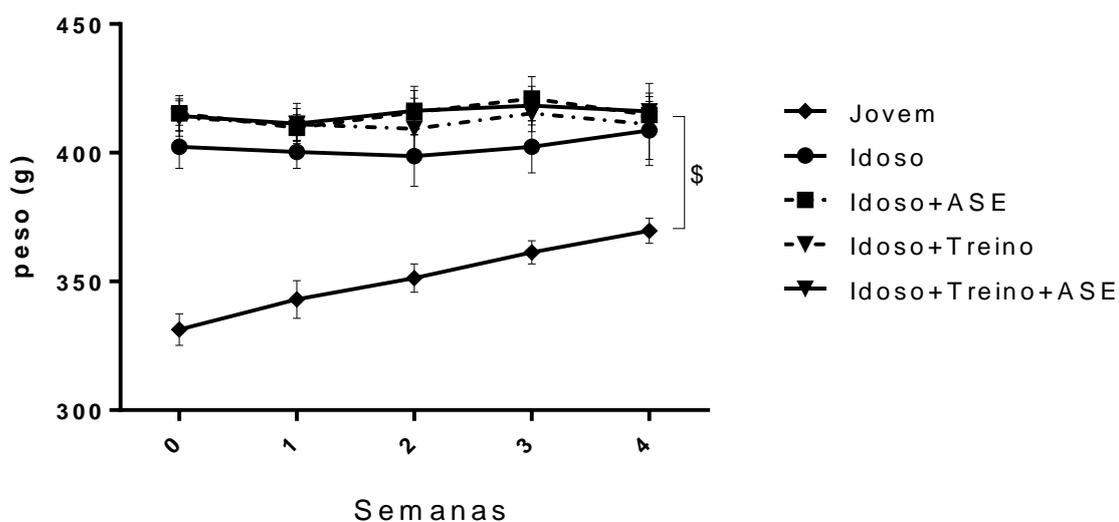
Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Foi utilizado para as análises estatísticas e obtenção dos gráficos o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad softwares, Inc., San Diego, CA, EUA). Os dados foram analisados utilizando-se One--way analysis of variance e Two--way analysis of variance (ANOVA), para comparar as diferenças entre os diversos grupos experimentais, com posterior uso do pós-teste Tukey, e Teste-T para comparar as diferenças entre o mesmo grupo (pareado) e dois grupos distintos (não pareado). Sendo considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício sobre o peso corporal

Os animais do grupo Jovem apresentaram um menor ( $p<0,05$ ) peso corporal quando comparamos aos demais grupos de animais idosos em todo o período de estudo (Figura 9). Não houve diferença entre os grupos de idosos.

Figura 9 - Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o peso corporal



Legenda: Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o peso corporal.

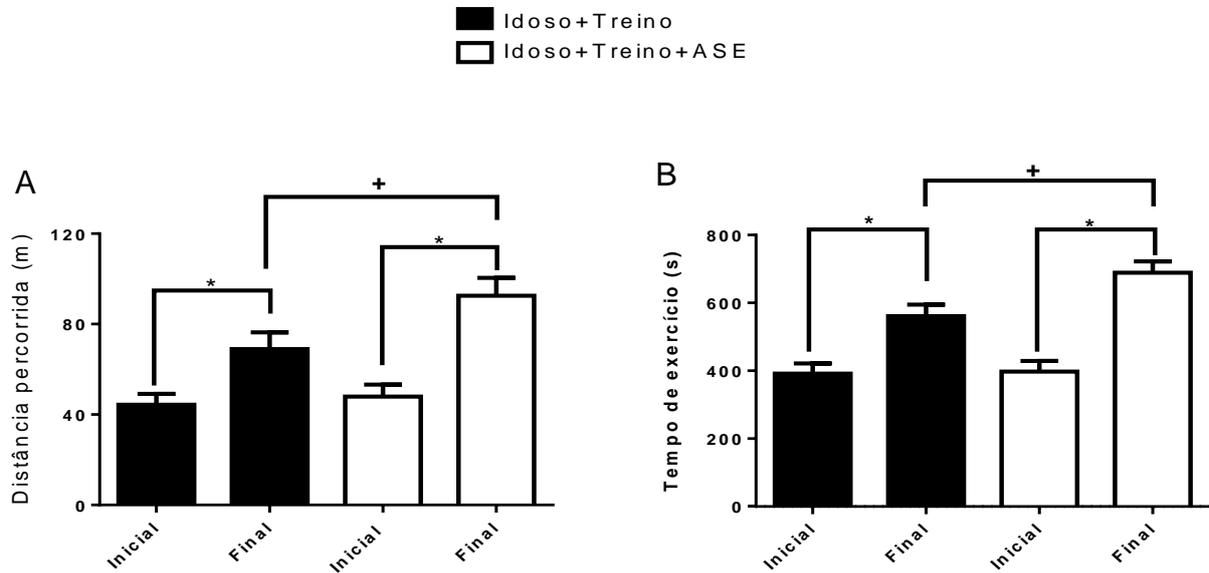
Nota: Os valores são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média,  $n=15$  ratos wistar machos por grupo. \$ ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo Jovem conforme determinado pelo teste Two-way ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O autor, 2021.

### **3.2 Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade física no teste progressivo máximo**

No primeiro teste progressivo máximo, realizado antes do início do tratamento com ASE e do treinamento físico crônico, nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos Idoso + Treino e Idoso + Treino + ASE para a distância percorrida (Figura 10A) e o tempo de exercício (Figura 10B). Após quatro semanas de tratamento com ASE e de atividade física regular, no final do experimento, foi realizado o segundo teste progressivo máximo. Neste teste foi constatado, que os animais do grupo Idoso+Treino e Idoso+Treino+ASE percorreram uma distância maior e se exercitaram por mais tempo ( $p < 0,05$ ) na esteira rolante, quando comparados aos seus respectivos testes de esforço inicial. Também observamos um aumento na distância percorrida e do tempo de exercício do teste progressivo máximo final no grupo Idoso+Treino+ASE quando comparado ao teste progressivo máximo final do grupo Idoso+Treino (Figura 10A e 10B), demonstrando uma interação positiva entre o tratamento com ASE e o exercício.

Figura 10 – Comparação do efeito do tratamento com ASE sobre a distância percorrida e o tempo de exercício



Legenda: Distância percorrida (A) e tempo de exercício (B) durante o teste de esforço antes do tratamento com ASE e do treinamento físico crônico (inicial) e após o final do mesmo (final).

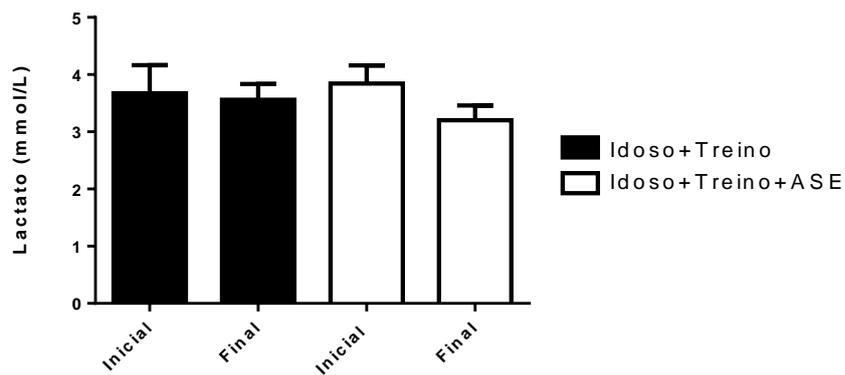
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=16$  ratos wistar machos por grupo.  $*(p<0,05)$  em relação ao Teste de esforço inicial,  $+$  ( $p<0,05$ ) em relação ao grupo Idoso+Treino. Teste-t. pareado, inicial e final do mesmo grupo, e Teste-t não pareado comparação entre grupos.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.3 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de lactato

Os níveis de lactato presentes no sangue foram mensurados imediatamente após o primeiro e o último teste de esforço dos grupos submetidos ao treinamento físico aeróbico (Idoso+Treino e Idoso+Treino+ASE). Não houve diferença significativa entre os grupos, assim como entre a primeira (inicial) e a última mensuração (final) (Figura 11).

Figura 11 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de lactato



Legenda: Medida de lactato antes do tratamento com ASE e do treinamento físico crônico (inicial) e após o final do mesmo (final)

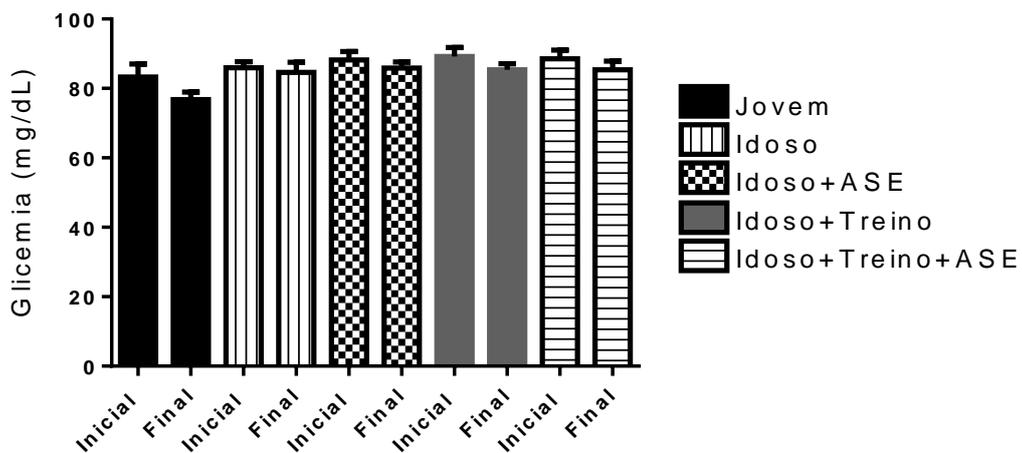
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=16 ratos wistar machos por grupo. Teste-t. pareado, inicial e final do mesmo grupo, e Teste-t não pareado comparação entre grupos.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.4 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis de glicemia

Os níveis de glicose foram mensurados uma vez antes e outra após as quatro semanas de treinamento crônico e o tratamento com ASE. Não houve diferença dos níveis glicêmicos entre os animais dos diferentes grupos estudados, tanto na medida inicial como na medida final (Figura 12).

Figura 12 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre os níveis glicêmicos



Legenda: Medida de glicemia antes (inicial) e após o tratamento com ASE e o treinamento físico crônico (final)

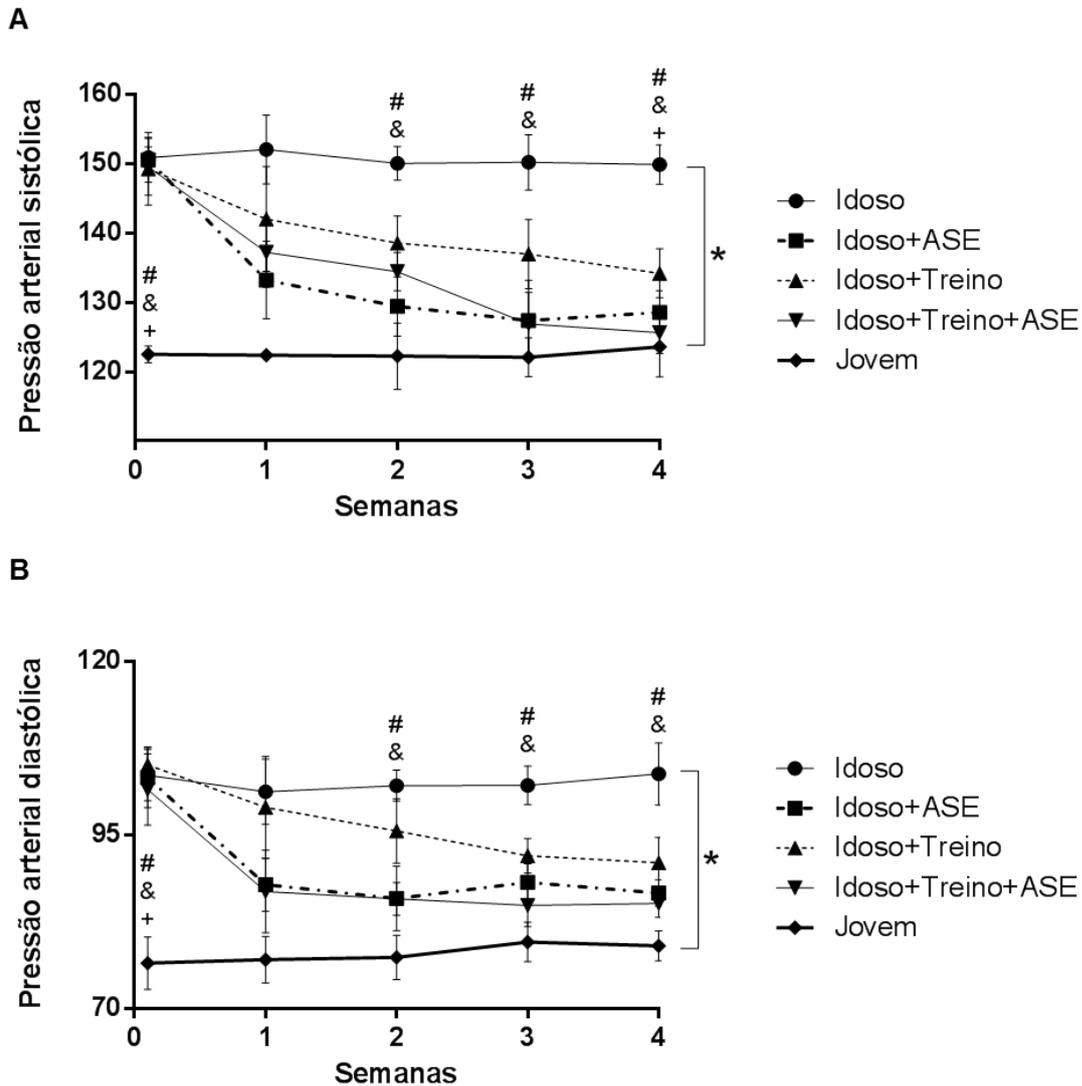
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=15 ratos Wistar machos por grupo. *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.5 Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico na pressão arterial

Ao longo de todo o período experimental, os valores da PAS (Figura 13A) e PAD (Figura 13B) do grupo Idoso foram maiores ( $p < 0,05$ ), do que os observados no grupo Jovem, caracterizando uma hipertensão nos animais idosos. No início da primeira semana de tratamento experimental, os valores da PAS (Figura 13A) e PAD (Figura 13B) dos animais Jovens foram menores do que os valores de todos os grupos de animais Idosos ( $p < 0,05$ ). Os grupos Idoso+ASE e Idoso+Treino+ASE apresentaram valores da PAS e PAD menores ( $p < 0,05$ ) que o grupo Idoso na segunda, terceira e quarta semanas de experimento (Figura 13A e 13B). O grupo Idoso+Treino apresentou valores da PAS menores ( $p < 0,05$ ) que os do grupo Idoso, apenas na quarta semana do período experimental. Não houve diferença entre os grupos Idoso+ASE, Idoso+Treino e Idoso+Treino+ASE.

Figura 13 - Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a pressão arterial



Legenda: Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a pressão arterial.

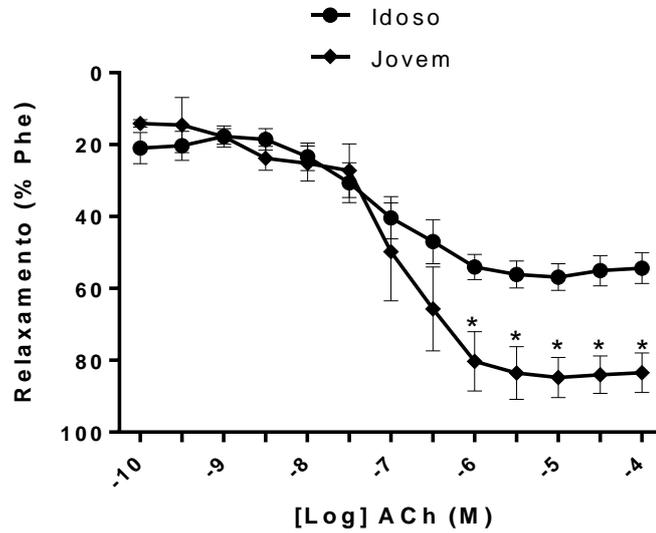
Nota: Os valores são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média. \* ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Idoso, + ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Idoso+Treino, & ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Idoso+ASE e # ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Idoso+Treino+ASE conforme determinado pelo teste Two-way ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.6 Efeito da Idade sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em anel de aorta de rato

A acetilcolina (ACh) produziu uma curva concentração-efeito onde a resposta vasodilatadora foi maior ( $p < 0,05$ ) em anel de aorta isolado de animais do grupo Jovem comparado ao grupo Idoso nas concentrações de  $10^{-6}$  mol/L até  $10^{-4}$  mol/L (figura 14). A resposta vasodilatadora máxima (Emax) induzida pela ACh foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nos animais do grupo Jovem comparado aos Idosos (Tabela 1), o que demonstra uma perda da função endotelial no grupo idoso. Não houve diferença entre a potência (EC50) de ambas as curvas (Tabela 1).

Figura 14 - Efeito da idade sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em anel de aorta de rato



Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=8 ratos wistar machos por grupo. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Idoso, conforme determinado pelo Teste-T não pareado.  
Fonte: O autor, 2021.

### 3.7 Efeitos do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em anel de aorta de ratos Idosos

A ACh produziu uma curva concentração-efeito onde a resposta vasodilatadora foi maior ( $p < 0,05$ ) em anel de aorta de animais do grupo Idoso+ASE comparada a do grupo Idoso nas seguintes concentrações ( $3 \times 10^{-5}$  mol/L e  $10^{-4}$  mol/L) (Figura 15A). O treinamento físico crônico aumentou ( $p < 0,05$ ) a resposta vasodilatadora da ACh nos animais do grupo Idoso+Treino em relação ao grupo Idoso nas três últimas concentrações (Figura 15B). A associação do treinamento físico e a suplementação com o ASE produziu um aumento ( $p < 0,05$ ) da resposta vasodilatadora nas concentrações de  $10^{-7}$  mol/L até  $10^{-4}$  mol/L em relação ao grupo Idoso (Figura 15C), indicando uma interação positiva entre o tratamento com ASE e o exercício. Tanto o tratamento com ASE ou exercício isoladamente ou associados produziram um efeito máximo significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo Idoso (Tabela 1). Não houve diferença estatística na resposta vasodilatadora da ACh, assim como de sua potência entre as curvas concentração-efeito dos três diferentes grupos: idoso+ASE, Idoso+Treino e Idoso+Treino+ASE, em relação ao grupo de animais Jovens (Figura 15D) (Tabela 1), indicando que tanto o tratamento com ASE ou exercício isoladamente ou associados promoveram nos grupos idosos uma resposta semelhante a do grupo de jovens, anulando a diferença de reatividade à Ach entre jovens e idosos.

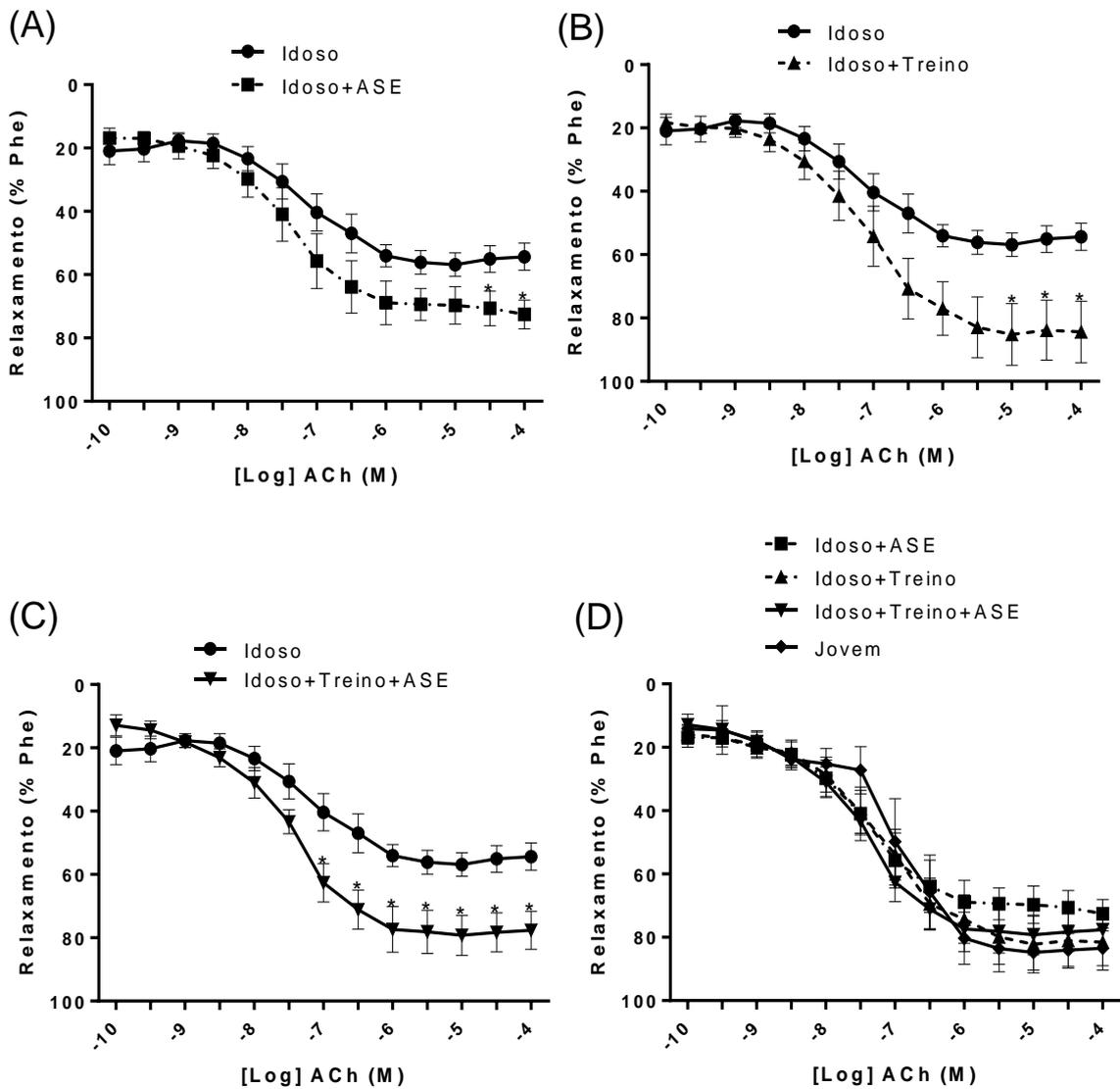
Tabela 1 - Efeito máximo (Emax) e EC50 da curva concentração-efeito da acetilcolina em anel de aorta

Grupo	Emax (% relaxamento)	EC50 (mol/L)
Jovem	$84,79 \pm 5,615$ *	$1,2 \times 10^{-7} \pm 6 \times 10^{-8}$
Idoso	$56,86 \pm 3,695$	$1,5 \times 10^{-7} \pm 3,6 \times 10^{-8}$
Idoso+ASE	$72,55 \pm 4,537$ *	$1,2 \times 10^{-7} \pm 2,3 \times 10^{-8}$
Idoso+Treino	$84,40 \pm 9,707$ *	$1,7 \times 10^{-7} \pm 3,7 \times 10^{-8}$
Idoso+Treino+ASE	$79,22 \pm 6,289$ *	$1,7 \times 10^{-7} \pm 2,2 \times 10^{-8}$

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Idoso em (A), (B) e (C), conforme determinado pelo Teste-T não pareado (A),(B),(C) e *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey (D).

Fonte: O autor, 2021.

Figura 15 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em anel de aorta de rato idoso

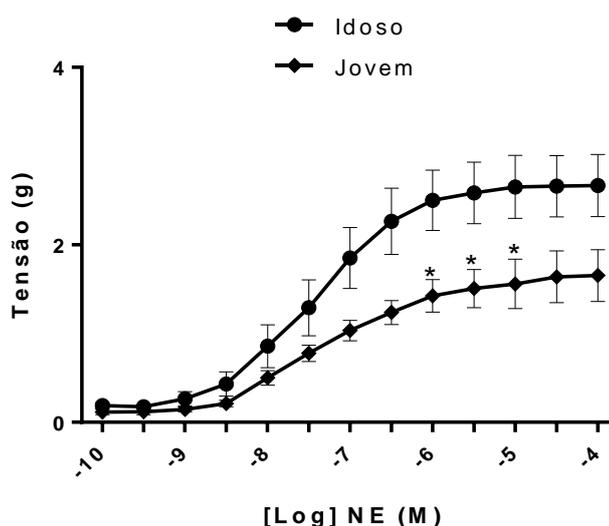


Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=8 ratos wistar machos por grupo. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Idoso conforme determinado pelo Teste-T não pareado.  
Fonte: O autor, 2021.

### 3.8 Efeito da idade sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em anel de aorta de rato

A norepinefrina (NE) produziu uma curva concentração-efeito onde a resposta vasoconstritora foi maior ( $p < 0,05$ ) em anel de aorta isolado de animais do grupo Idoso quando comparada ao grupo Jovem, nas concentrações de  $10^{-6}$  mol/L,  $3 \times 10^{-6}$  mol/L e  $10^{-5}$  mol/L (Figura 16). Entretanto, não houve diferença entre os grupos quanto a potência e efeito máximo da NE (Tabela 2).

Figura 16 - Efeito da idade sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em anel de aorta de rato



Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=8$  ratos wistar machos por grupo. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Idoso conforme determinado pelo Teste-T não pareado. Fonte: O autor, 2021.

Tabela 2 - Efeito máximo (Emax) e EC50 da curva concentração-efeito da norepinefrina em anel de aorta

<b>Grupo</b>	<b>Emax (tensão em gramas)</b>	<b>EC50 (mol/L)</b>
<b>Jovem</b>	1,621 ± 0,3	$1,8 \times 10^{-7} \pm 3,3 \times 10^{-8}$
<b>Idoso</b>	2,669 ± 0,34	$1,8 \times 10^{-7} \pm 3,3 \times 10^{-8}$
<b>Idoso+ASE</b>	1,904 ± 0,24	$1,5 \times 10^{-7} \pm 2,6 \times 10^{-8}$
<b>Idoso+Treino</b>	2,000 ± 0,1936	$1,4 \times 10^{-7} \pm 3,3 \times 10^{-8}$
<b>Idoso+Treino+ASE</b>	2,016 ± 0,1835	$1,9 \times 10^{-7} \pm 2,8 \times 10^{-8}$

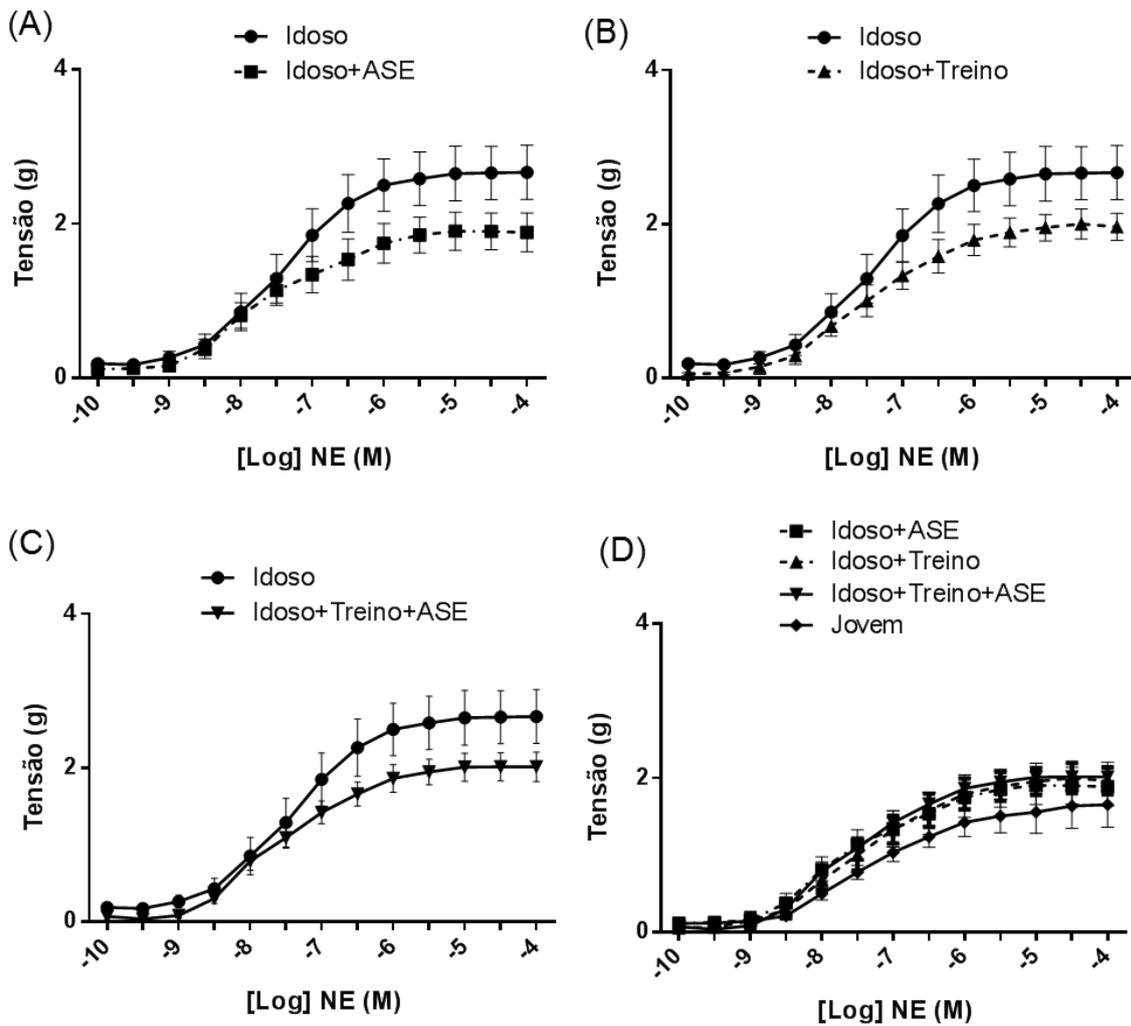
Nota: Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.9 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstrictora da norepinefrina em anel de aorta de rato idoso

Observamos uma tendência de redução da hiperreatividade à NE em animais dos três grupos experimentais Idoso+ASE, Idoso+Treino e Idoso+Treino+ASE em relação ao grupo idoso (Figuras 17A, B e C), entretanto não houve diferença significativa na resposta vasoconstrictora induzida pelo vasoconstritor entre os grupos (Figura 17 e Tabela 2). Ao mesmo tempo, não observamos diferença, no efeito máximo e na potência dos três diferentes grupos: Idoso+ASE, Idoso+Treino e Idoso+Treino+ASE, quando comparados aos animais Jovens (Figura 17 D), demonstrando que tanto o tratamento com ASE ou exercício isoladamente ou associados promoveram nos grupos idosos uma resposta semelhante a do grupo de jovens.

Figura 17 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em anel de aorta de rato idoso



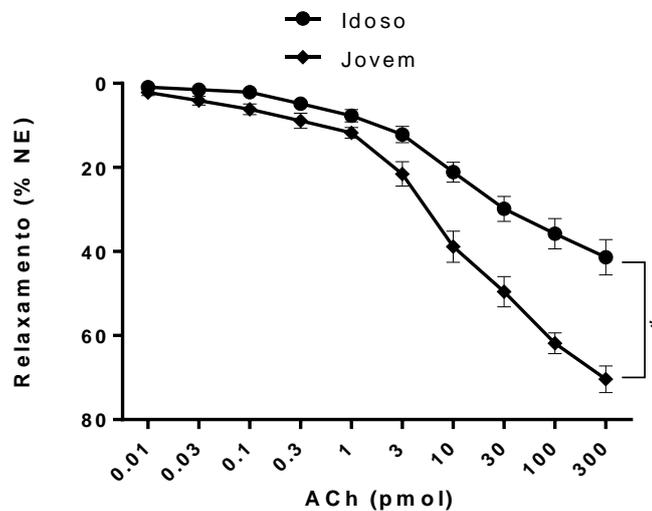
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=8 ratos wistar machos por grupo. Teste-T não pareado (A),(B),(C) e *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey (D).

Fonte: O autor, 2021.

### 3.10 Efeito da idade sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em LAM.

A ACh produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi maior ( $p < 0,05$ ) em LAM isolado de animais do grupo Jovem em relação aos animais do grupo Idoso em todas as doses da curva com exceção das menores doses de 0,01 e 1 pmol (figura 18). A resposta vasodilatadora máxima induzida pela ACh foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) no LAM dos animais do grupo Jovem comparada a do grupo Idoso (Tabela 3). Não houve diferença estatística entre o ED50 de ambas as curvas (Tabela 3).

Figura 18 - Efeito idade sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em leito arterial mesentérico



Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=8$  ratos wistar machos por grupo. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Idoso, conforme determinado pelo Teste-T não pareado  
 Fonte: O autor, 2021.

### 3.11 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em LAM de animais idosos

A ACh produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi maior ( $p < 0,05$ ) em LAM isolado de animais Idosos suplementados com ASE (Idoso+ASE), em relação aos animais Idosos, em pequenas doses (0,03 e 0,1 pmol) (Figura 19A). O grupo Idoso+Treino apresentou uma maior resposta vasodilatadora ( $p < 0,05$ ) apenas na dose de 0,1 pmol em relação aos animais Idosos (Figura 19B). A associação do treinamento físico com a suplementação com ASE (Idoso+Treino+ASE) produziu uma resposta vasodilatadora maior ( $p < 0,05$ ) em todos os pontos da curva (Figura 19C), assim como uma maior ( $p < 0,05$ ) potência comparada aos animais idosos não tratados (Tabela 3), indicando uma interação positiva entre o tratamento com ASE e o exercício. Quando realizamos a comparação entre os grupos Idoso+Treino+ASE; Idoso+ASE, Idoso+Treino e Jovem, observamos que a resposta vasodilatadora da ACh no LAM dos animais do grupo Jovem foi maior nas duas últimas doses (100 e 300 pmol), quando comparada a do grupo Idoso+Treino (Figura 19D), não sendo diferente dos demais grupos. O efeito máximo, assim como a potência da ACh não diferiram entre os grupos estudados (Tabela 3).

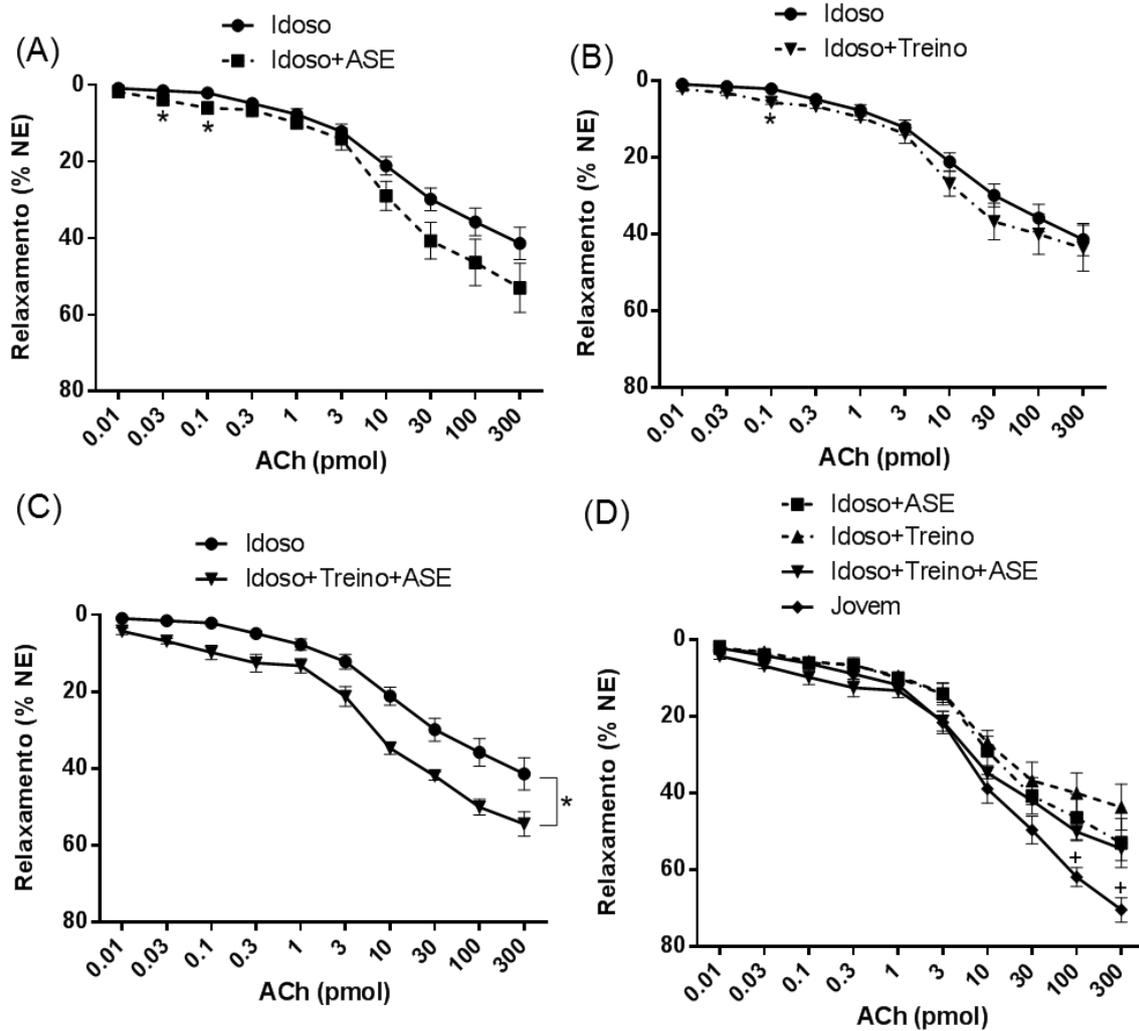
Tabela 3 - Efeito máximo (Emax) e ID50 da curva dose-resposta da acetilcolina em LAM

<b>Grupo</b>	<b>Emax (% relaxamento)</b>	<b>ID50 (pmol)</b>
<b>Jovem</b>	70,40 ± 3,163 *	7,90 ± 1,67
<b>Idoso</b>	41,38 ± 4,184	11,59 ± 1,61
<b>Idoso+ASE</b>	52,98 ± 6,382	7,60 ± 1,29
<b>Idoso+Treino</b>	43,61 ± 5,962	7,95 ± 1,16
<b>Idoso+Treino+ASE</b>	54,42 ± 3,17	5,77 ± 1,22 *

Nota: Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Idoso conforme determinado pelo Teste-t não pareado.

Fonte: O autor, 2021.

Figura 19 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em leito arterial mesentérico de ratos idosos



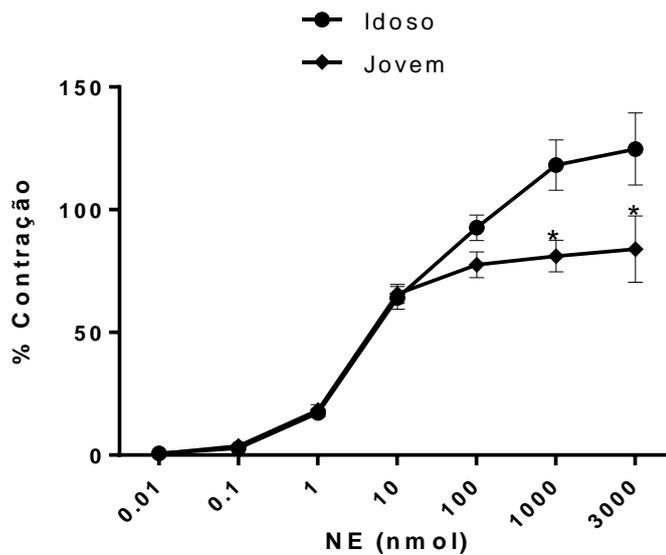
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=8$  ratos wistar machos por grupo. \* $p<0,05$  em relação ao grupo Idoso, + $p<0,05$  em relação ao grupo Idoso+Treino, conforme determinado pelo método *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.12 Efeito da idade sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em LAM

A NE produziu uma resposta vasoconstritora dose-dependente que foi menor ( $p < 0,05$ ) em LAM isolado de animais do grupo Jovem quando comparado ao grupo Idoso nas doses de 300, 1000 e 3000 nmol (figura 20). A potência da NE foi menor no grupo jovem ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao grupo Idoso (Tabela 4). Não houve diferença estatística entre o efeito máximo de ambos os grupos (Tabela 4).

Figura 20 - Efeito da idade sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em leito arterial mesentérico



Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=8$  ratos wistar machos por grupo. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Idoso, conforme determinado pelo Teste-T não pareado  
 Fonte: O autor, 2021.

### 3.13 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a resposta vasoconstritora da norepinefrina em LAM de animais idosos

A NE produziu uma resposta vasoconstritora dose-dependente menor ( $p < 0,05$ ) em LAM isolado de animais do grupo Idoso+ASE quando comparado ao grupo Idoso nas doses de 100, 1000 e 3000 nmol (Figura 21A). O grupo Idoso+Treino produziu uma menor resposta vasoconstritora ( $p < 0,05$ ) nas doses de 100, 1000 e 3000 nmol quando comparado ao grupo Idoso (Figura 21B). A associação do treinamento físico com a suplementação com ASE (Idoso+Treino+ASE) produziu uma resposta vasoconstritora menor ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Idoso nas doses de 100, 1000 e 3000 nmol (Figura 21C). Não observamos diferença estatística entre os grupos Idoso+ASE, Idoso+Treino, Idoso+Treino+ASE e Jovem (Figura 21D), demonstrando que tanto a suplementação com ASE ou exercício isoladamente ou associados promoveram nos grupos idosos uma resposta semelhante a do grupo de jovens. Todos os grupos apresentaram uma potência menor ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Idoso, contudo apenas o grupo Idoso+Treino+ASE apresentou um menor ( $p < 0,05$ ) efeito máximo em relação ao grupo idoso (Tabela 4).

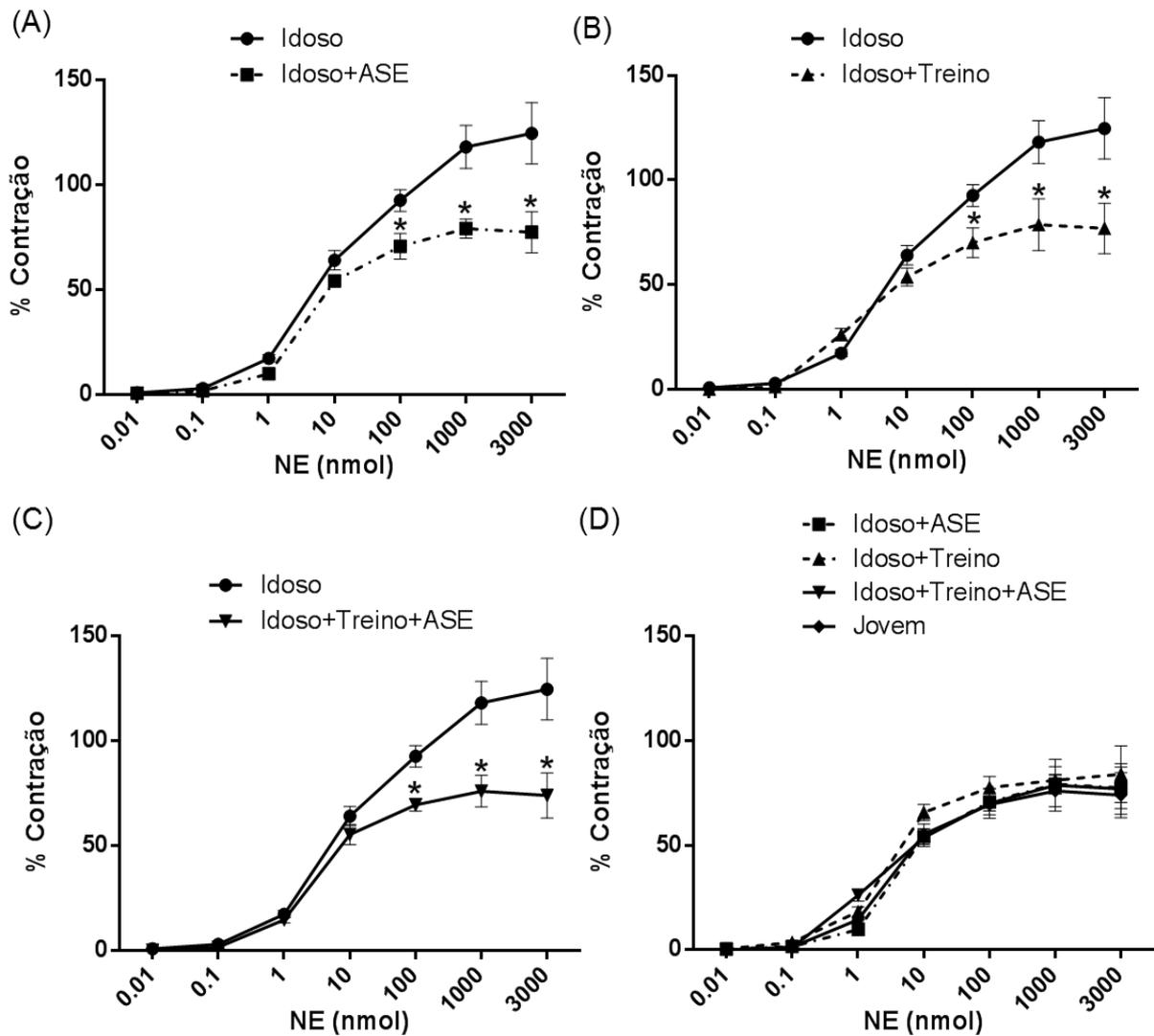
Tabela 4 - Efeito máximo (Emax) e ED50 da curva dose-resposta da norepinefrina em LAM

<b>Grupo</b>	<b>Emax (% contração)</b>	<b>ED50 (nmol)</b>
<b>Jovem</b>	93,3 ± 5,38	5,12 ± 0,70 *
<b>Idoso</b>	123,2 ± 12,59	13,05 ± 2,23
<b>Idoso+ASE</b>	91,1 ± 5,58	6,15 ± 0,40 *
<b>Idoso+Treino</b>	91,2 ± 5,07	6,57 ± 0,56 *
<b>Idoso+Treino+ASE</b>	86,2 ± 6,54 *	5,63 ± 0,28 *

Nota: Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo Idoso conforme determinado pelo Teste-t não pareado.

Fonte: O autor, 2021.

Figura 21 - Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre resposta vasoconstritora da norepinefrina em leito arterial mesentérico de animais idosos



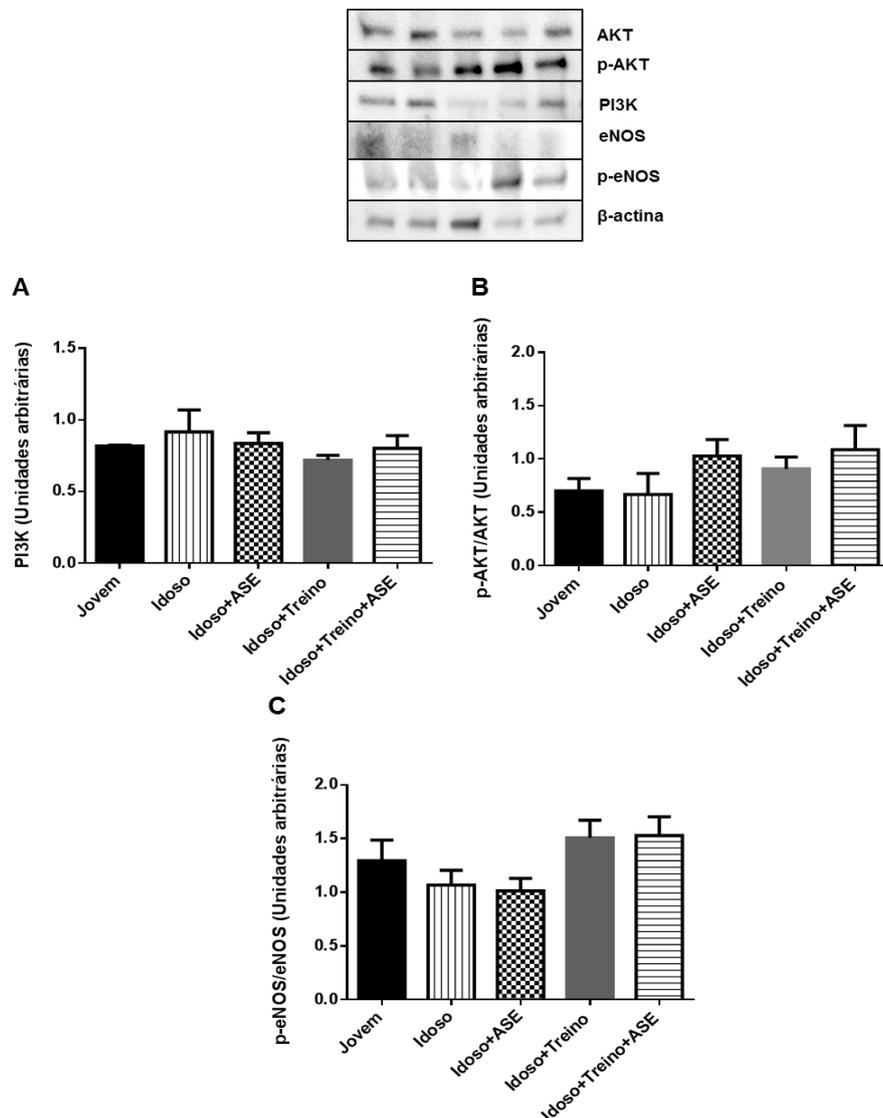
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=8$  ratos wistar machos por grupo.  $*p<0,05$  em relação ao grupo Idoso, conforme determinado pelo método *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.14 Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão da AKT, p-AKT, PI3K, eNOS e p-Enos em homogenato da artéria aorta

Não houve diferença significativa nos níveis dos marcadores de função vascular, PI3K (Figura 22A), AKT, e p-AKT (Figura 22B), eNOS e p-eNOS (Figura 22C), nos diferentes grupos estudados.

Figura 22 – Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão da PI3K, AKT, p-AKT, eNOS e p-eNOS em homogenato da artéria aorta



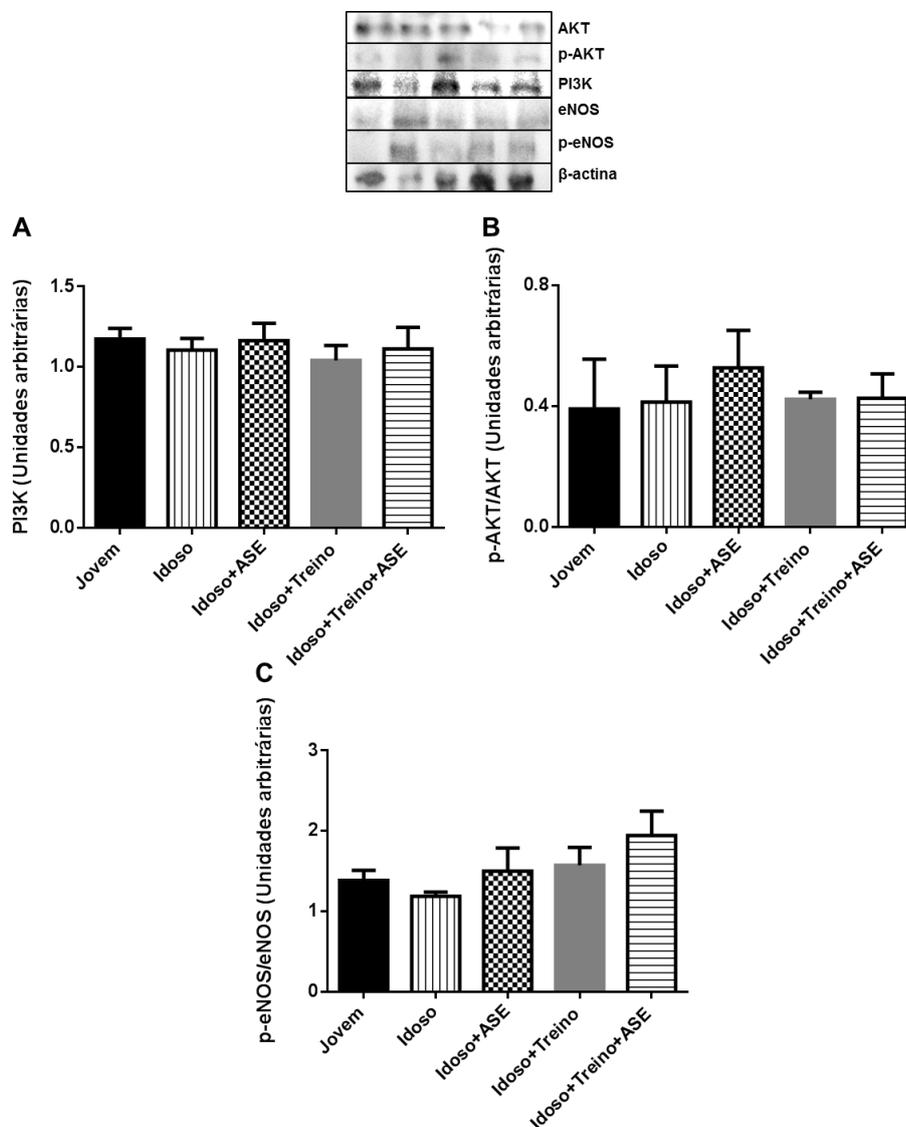
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=3 por grupo. *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.15. Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão da AKT, p-AKT, PI3K, eNOS e p-eNOS em homogenato de LAM

Não houve diferença significativa nos níveis da PI3K (Figura 23A), AKT, e p-AKT (Figura 23B), eNOS e p-eNOS (Figura 23C) nos diferentes grupos estudados.

Figura 23 – Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão da PI3K, AKT, p-AKT, eNOS e p-eNOS em homogenato de LAM



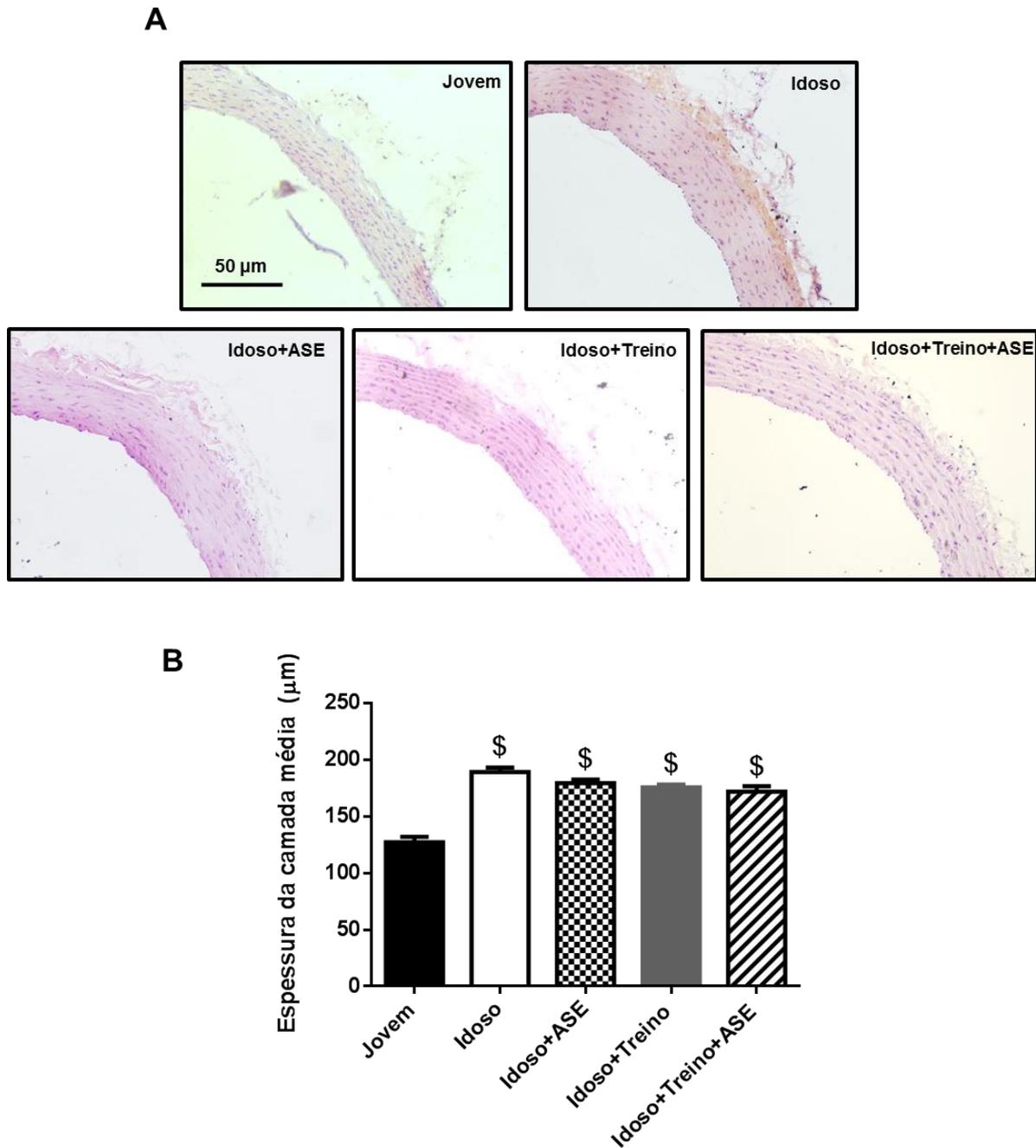
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=3 por grupo. *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O autor, 2021.

### **3.16 Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico na espessura da camada média da aorta**

A espessura da camada média da aorta dos animais Jovens foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que a dos demais grupos de animais Idosos (Figura 24A e B). Não houve diferença significativa entre os animais tratados com ASE, que realizaram o treinamento físico ou a associação de ambos comparados aos animais do grupo Idoso (Figura 24A e B).

Figura 24 – Efeito do tratamento com ASE e do treinamento físico crônico na espessura da camada média da aorta



Legenda: Efeito do tratamento com ASE e do treinamento físico na espessura da camada média (B) e as imagens representativas dos grupos (A): Jovem, Idoso, Idoso+ASE, Idoso+Treino, Idoso+Treino+ASE.

Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=5 ratos Wistar machos por grupo. \$ ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Jovem conforme determinado pelo método *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O autor, 2021.

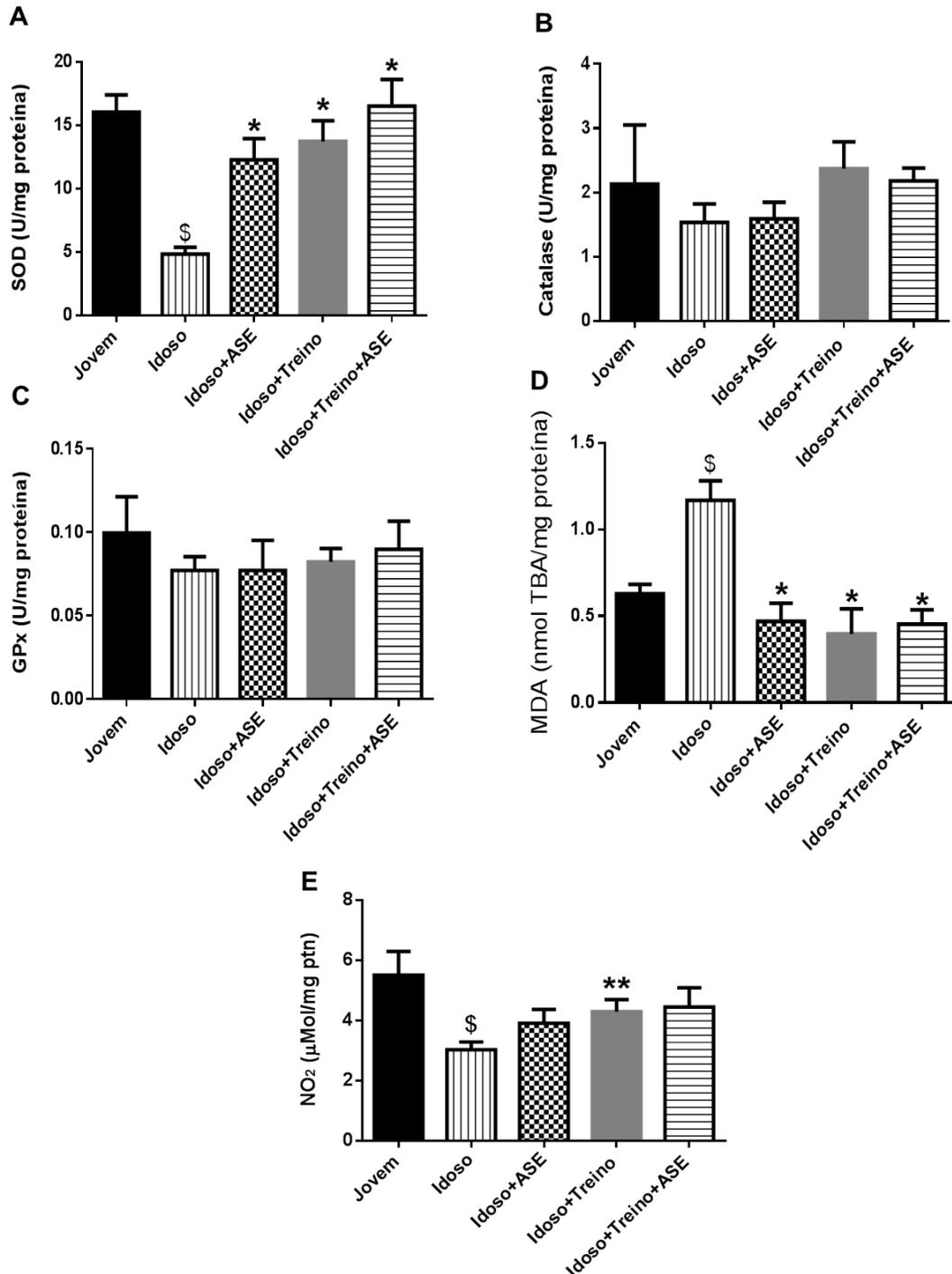
### **3.17 Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a atividade enzimática antioxidante, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato da artéria aorta**

A atividade da enzima SOD foi menor ( $p < 0,05$ ) em amostras do grupo Idoso comparado ao grupo Jovem, enquanto os grupos Idoso+ASE, Idoso+Treino e Idoso+Treino+ASE apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da atividade da enzima comparado ao grupo Idoso (Figura 25A). Não foi observada diferença significativa na atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase (GPx) em amostras da artéria aorta, nos diferentes grupos estudados (Figura 25B e 25C).

O dano oxidativo foi medido pelo ensaio pró-oxidante de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O grupo Idoso apresentou um aumento significativo da formação de subprodutos (malondialdeído-MDA) da peroxidação lipídica, em amostras de homogenato da artéria aorta comparado ao grupo Jovem. Os tratamentos com ASE, treinamento físico crônico e a associação de ambos reduziram significativamente os níveis de malondialdeído-MDA em relação ao grupo Idoso (Figura 25D).

As amostras do grupo Idoso também apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) dos níveis de nitrito em relação ao grupo Jovem (Figura 25E), sendo que o grupo Idoso+Treino demonstrou um aumento ( $p < 0,05$ ) dos níveis de nitrito em relação ao grupo Idoso (Figura 25E). Não houve diferença dos grupos Idoso+ASE e Idoso+Treino+ASE em relação aos grupos Idoso e Jovem.

Figura 25 – Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade enzimática, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato da artéria aorta



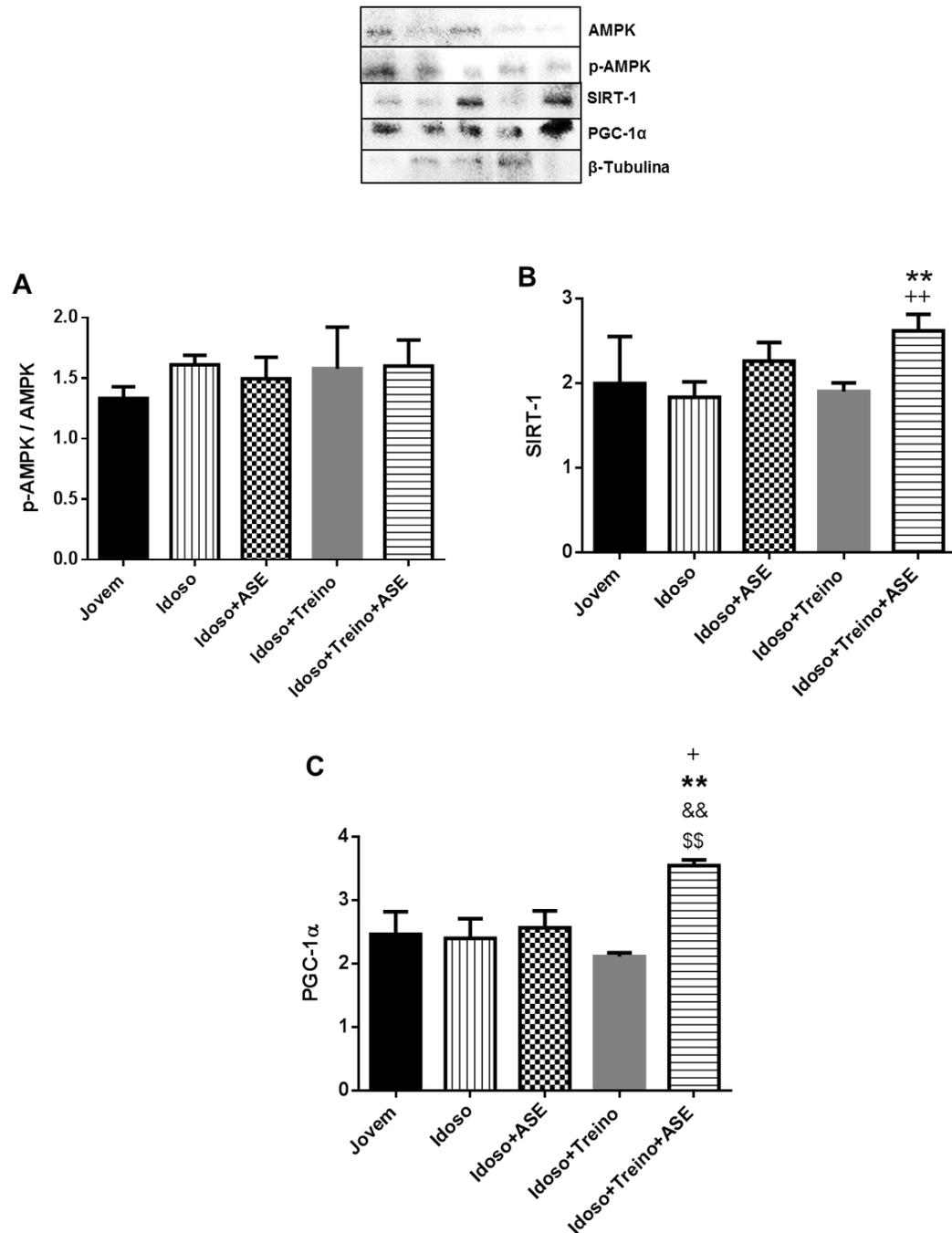
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=6 ratos Wistar machos por grupo. \$ (p<0,05) em relação ao grupo Jovem; \* (p<0,05) em relação ao grupo Idoso, conforme determinado pelo método *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\* (p<0,05) em relação ao grupo Idoso, conforme determinado pelo Teste-T não pareado.

Fonte: O autor, 2021.

### **3. 18 Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão da AMPK, p-AMPK, SIRT-1, e PGC-1 $\alpha$ em homogenato de tecido muscular esquelético**

Avaliamos a expressão de marcadores da biogênese mitocondrial (AMPK, SIRT-1 e PGC-1 $\alpha$ ). Não houve diferença na expressão entre grupos Idoso e Jovem para os diferentes marcadores (figura 26). Os níveis das proteínas AMPK e p-AMPK não foram alterados entre os diferentes grupos estudados (Figura 26A). O treinamento físico associado ao tratamento com ASE aumentou a expressão ( $p < 0,05$ ) da proteína SIRT-1 em relação aos grupos Idoso e Idoso+Treino (Figura 26B) e da PGC1 $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) em relação a todos os outros grupos experimentais (Figura 26C), indicando que a associação do tratamento com ASE e o exercício ativaram a via SIRT1-PGC-1 $\alpha$ .

Figura 26 – Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a expressão da AMPK, p-AMPK, SIRT-1 e PGC-1 $\alpha$  em homogenato de tecido muscular esquelético



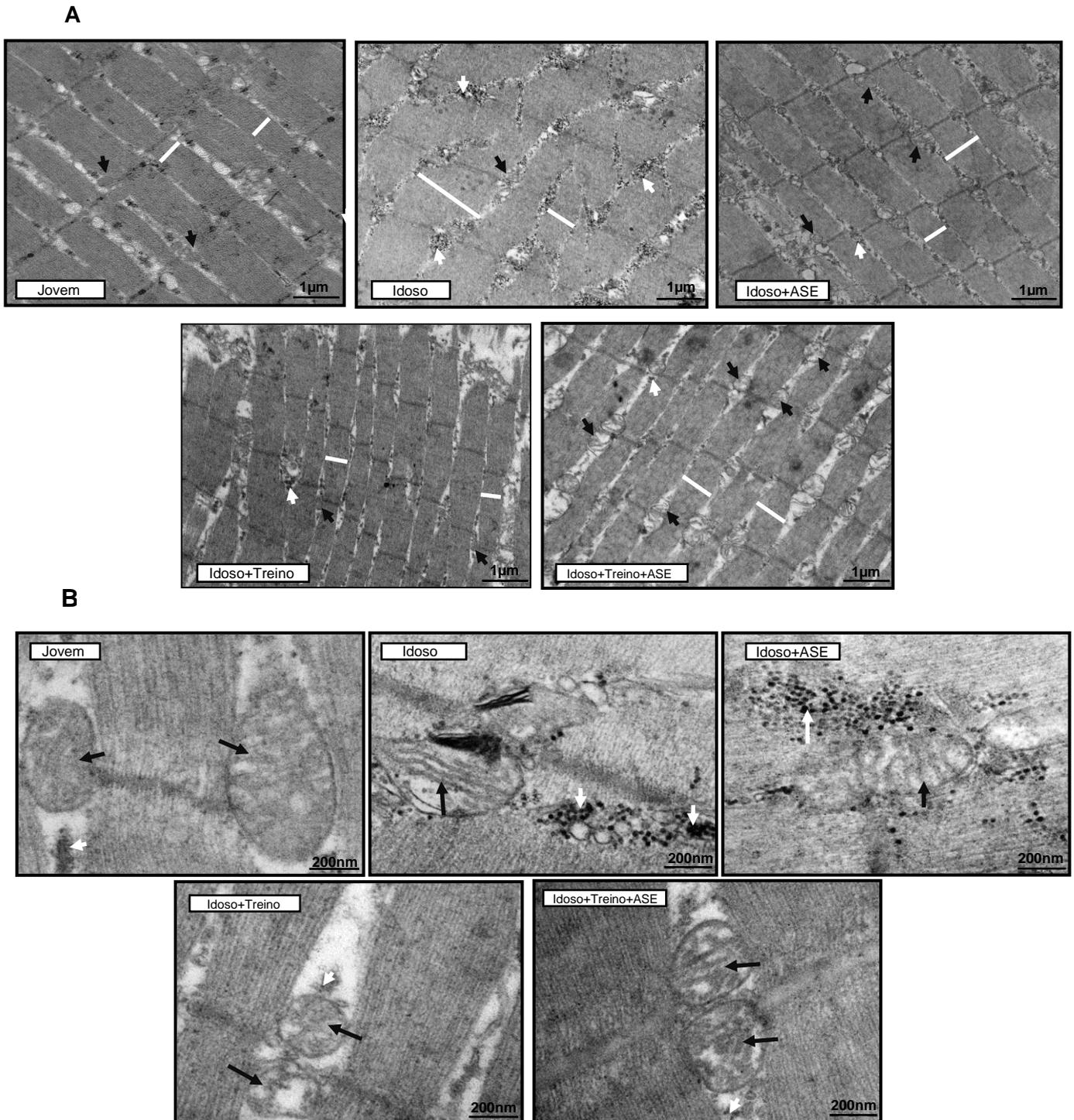
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=3 por grupo. + (p<0,05) em relação ao grupo Idoso+Treino, conforme determinado pelo método *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. \$\$ (p<0,05) em relação ao grupo Jovem, \*\* (p<0,05) em relação ao grupo Idoso, && (p<0,05) em relação ao grupo Idoso+ASE, conforme determinado pelo Teste-T não pareado.

Fonte: O autor, 2021.

### **3.19 Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre as mitocôndrias, as partículas de glicogênio e as miofibrilas do músculo esquelético**

A ultraestrutura demonstrou que a musculatura esquelética do animal jovem aparentemente apresenta miofibrilas preservadas e mitocôndrias com padrões regulares com grande número de cristas mitocondriais, com poucos grânulos de glicogênio (Figura 27A e B). Contudo, o animal idoso apresentou grande acúmulo de grânulos de glicogênio, com miofibrilas menos regulares e mitocôndrias com menor número de cristas mitocondriais de aspecto menos regular (Figura 27A e B). Por sua vez, o animal idoso suplementado com ASE também apresentou acúmulo de glicogênio, mitocôndrias com aspecto mais regular e mais cristas mitocondriais do que o animal idoso, bem como miofibrilas regulares (Figura 27A e B). O animal pertencente ao grupo Idoso+Treino apresentou miofibrilas bem preservadas, pouco acúmulo de glicogênio e mitocôndrias regulares, bem preservadas, de menor tamanho (Figura 27A e B). Por fim, o animal Idoso que realizou atividade física crônica e suplementado com ASE apresentou alto número de mitocôndrias regulares de maior tamanho e com mais cristas mitocondriais em relação ao animal Idoso+Treino, com miofibrilas bem preservadas e baixo nível de glicogênio (Figura 27A e B).

Figura 27- Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre as mitocôndrias, as partículas de glicogênio e as miofibrilas do músculo esquelético



Legenda: Análise da ultraestrutura do músculo esquelético, n=2 por grupo. (A) Miofibrilas (barra branca), glicogênio (seta branca) e mitocôndrias (seta preta). Aumento 15.000x Barra de calibração 1µm. (B) Glicogênio (seta branca) e cristas mitocôndriais (seta preta). Aumento 75.000x. Barra de calibração 200nm.

Fonte: O autor, 2021.

### **3.20 Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a atividade enzimática antioxidante, a expressão de Nrf-2, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato de tecido muscular esquelético**

No tecido muscular esquelético, não foi observada diferença nas atividades das enzimas SOD, catalase e GPx de animais do grupo Idoso em relação ao grupo jovem (Figura 28A, B e C). Observamos um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na atividade da enzima SOD em amostras do grupo Idoso+Treino+ASE comparado aos grupos Idoso, Idoso+ASE e Idoso+Treino (Figura 28A). As atividades das enzimas catalase e glutathione peroxidase não foram diferentes dos demais grupos estudados (Figura 28B e 28C).

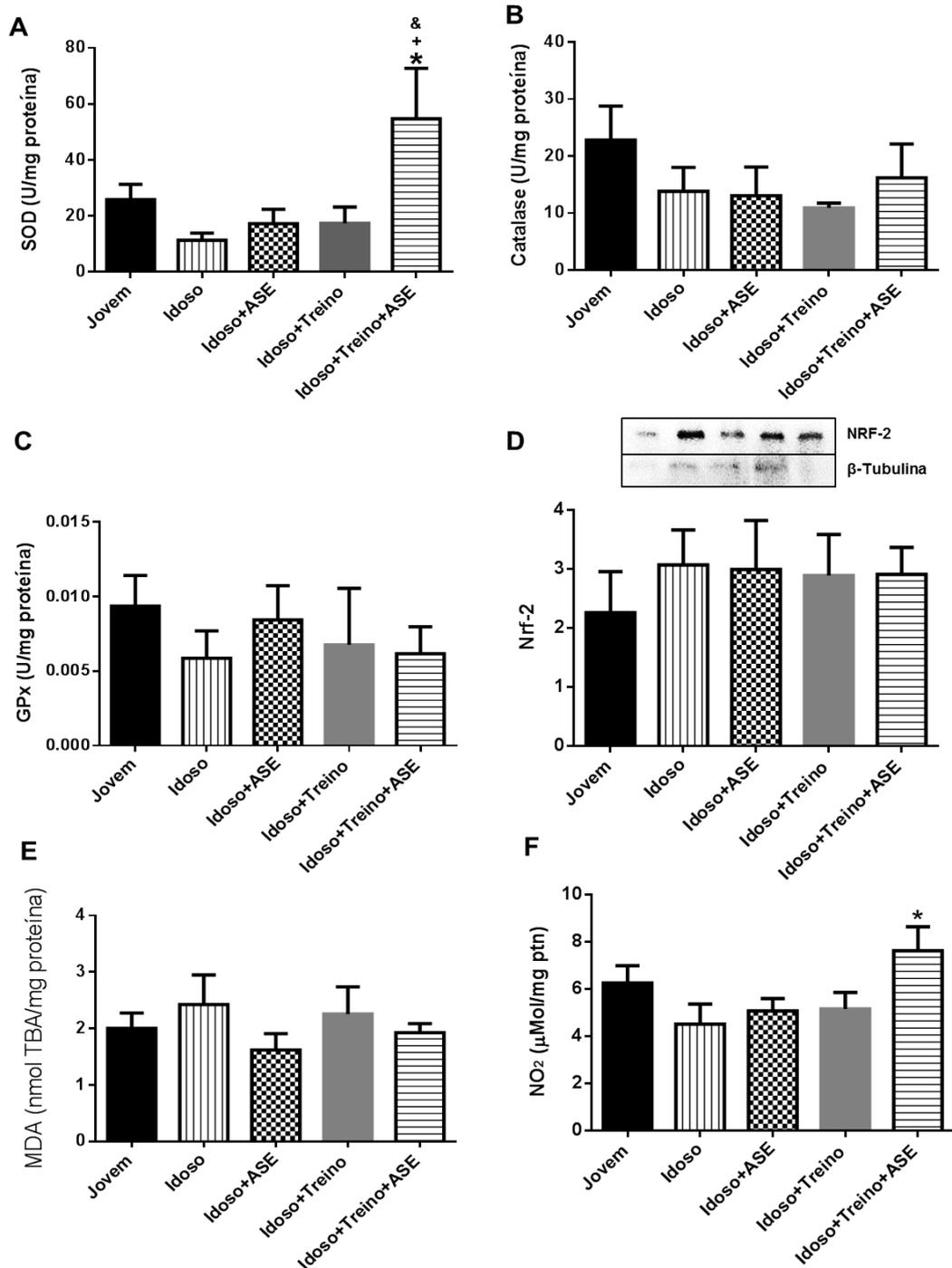
A expressão do fator de transcrição Nrf-2 relacionado ao aumento de proteínas antioxidantes, não foi alterada entre os diferentes grupos estudados (Figura 28D).

O dano oxidativo medido pela formação de subprodutos (malondialdeído-MDA) da peroxidação lipídica, não foi diferente em homogenato de tecido muscular esquelético entre os grupos estudados (Figura 28E).

Um aumento dos níveis de nitrito foi observado em amostras do grupo Idoso+Treino+ASE comparado ao grupo Idoso (Figura 28F).

Os achados da atividade da enzima SOD e dos níveis de nitrito indicam que a associação do tratamento com ASE e o exercício melhorou a defesa antioxidante e aumentou a biodisponibilidade de ON.

Figura 28 – Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade enzimática, o nível de Nrf-2, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato de tecido muscular esquelético



Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=8 ratos Wistar machos por grupo, exceto figura D, onde n=3. \* ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Idoso, + ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Idoso+Treino e & ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo Idoso+, conforme determinado pelo método *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

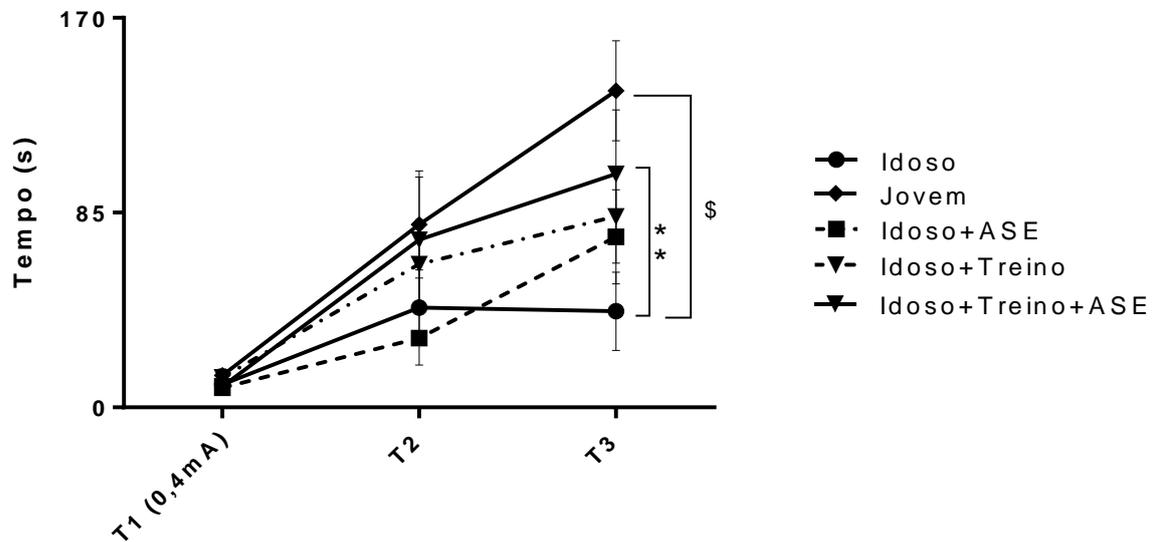
Fonte: O autor, 2021.

### 3.21 Efeito do tratamento com ASE e do exercício físico sobre o teste de Esquiva Passiva

Os tempos de descida da plataforma do equipamento de esquiva passiva no primeiro teste (T1), no qual o choque é aplicado após a descida da plataforma e do teste realizado após 3 horas do teste inicial (T2), não apresentaram diferença significativa entre os grupos (figura 29). No teste realizado 24 horas após o teste inicial (T3), o padrão de resultados indica uma deficiência no desempenho dos animais Idosos em relação aos animais Jovens. A associação do treinamento físico aeróbico e o tratamento com ASE nos animais do grupo Idoso+Treino+ASE aumentou significativamente o tempo de descida na plataforma em relação ao controle (Idoso) (figura 29). Os animais que realizaram o treinamento físico aeróbico crônico (Idoso+Treino) e o tratamento com ASE (Idoso+ASE) isoladamente não apresentaram diferença significativa do tempo de descida da plataforma em relação aos demais grupos (figura 28). Todos os grupos apresentaram um aumento no tempo de descida da plataforma tanto do teste 1 para o 2, como do teste 1 para o 3 (Figura 29).

Foi realizada uma análise complementar, usando as diferenças de tempo entre pares de testes. Não observamos diferença significativa entre os grupos na análise para o par de testes na comparação de tempo de descida de plataforma no teste 2, subtraído pelo tempo de descida na plataforma no teste 1 (T2 - T1) (Figura 30A). Contudo, na comparação de tempo de descida de plataforma no teste 3 subtraído pelo tempo de descida na plataforma no teste 1 (T3 - T1) observamos que as diferenças foram menores para o grupo Idoso em relação aos grupos Jovem e Idoso+Treino+ASE ( $p < 0,05$ ) (Figura 30B).

Figura 29 - Teste de Esquiva Passiva – dados brutos

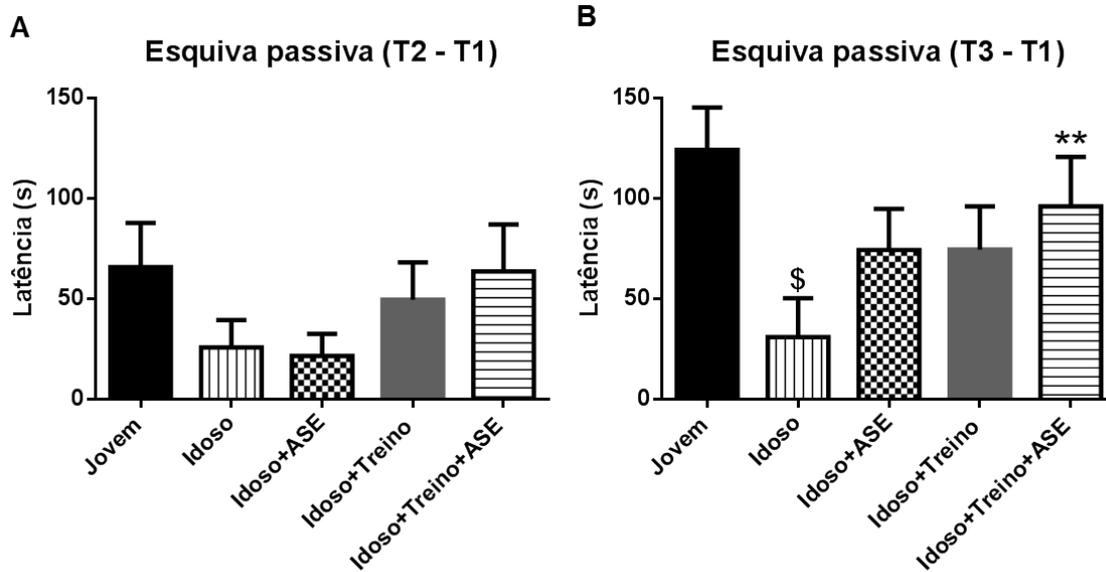


Legenda: Somente no teste T1 os animais foram submetidos a um choque de 0,4 mA com duração de 3s ao descerem da plataforma. (T2) teste realizado 3 horas após o teste inicial. (T3) este realizado 24 h após o teste inicial.

Nota: Os valores são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média,  $n=12$  para o grupo Jovem,  $n=12$  para o grupo idoso,  $n=10$  para o Idoso+ASE,  $n=13$  para o grupo Idoso+Treino e  $n=10$  para o grupo idoso+Treino+ASE. \$  $p<0,05$  em relação ao grupo Jovem conforme determinado pelo método *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*  $p<0,05$  em relação ao grupo Idoso conforme determinado pelo Teste-T não pareado.

Fonte: O autor, 2021.

Figura 30 - Teste de Esquiva Passiva (dados de diferença de tempo entre testes)



Legenda. A diferença de tempo entre testes foi significativa para o par de testes (T3-T1), indicando que as diferenças, nestas comparações, foram menores para o grupo Idoso em relação aos grupos Jovens e Idoso+Treino+ASE.

Nota: Os valores são expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média,  $n=12$  para o grupo Jovem,  $n=12$  para o grupo idoso,  $n=10$  para o Idoso+ASE,  $n=13$  para o grupo Idoso+Treino e  $n=10$  para o grupo idoso+Treino+ASE. \$  $p<0,05$  em relação ao grupo Jovem conforme determinado pelo método *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. \*\*  $p<0,05$  em relação ao grupo Idoso conforme determinado pelo Teste-T não pareado.

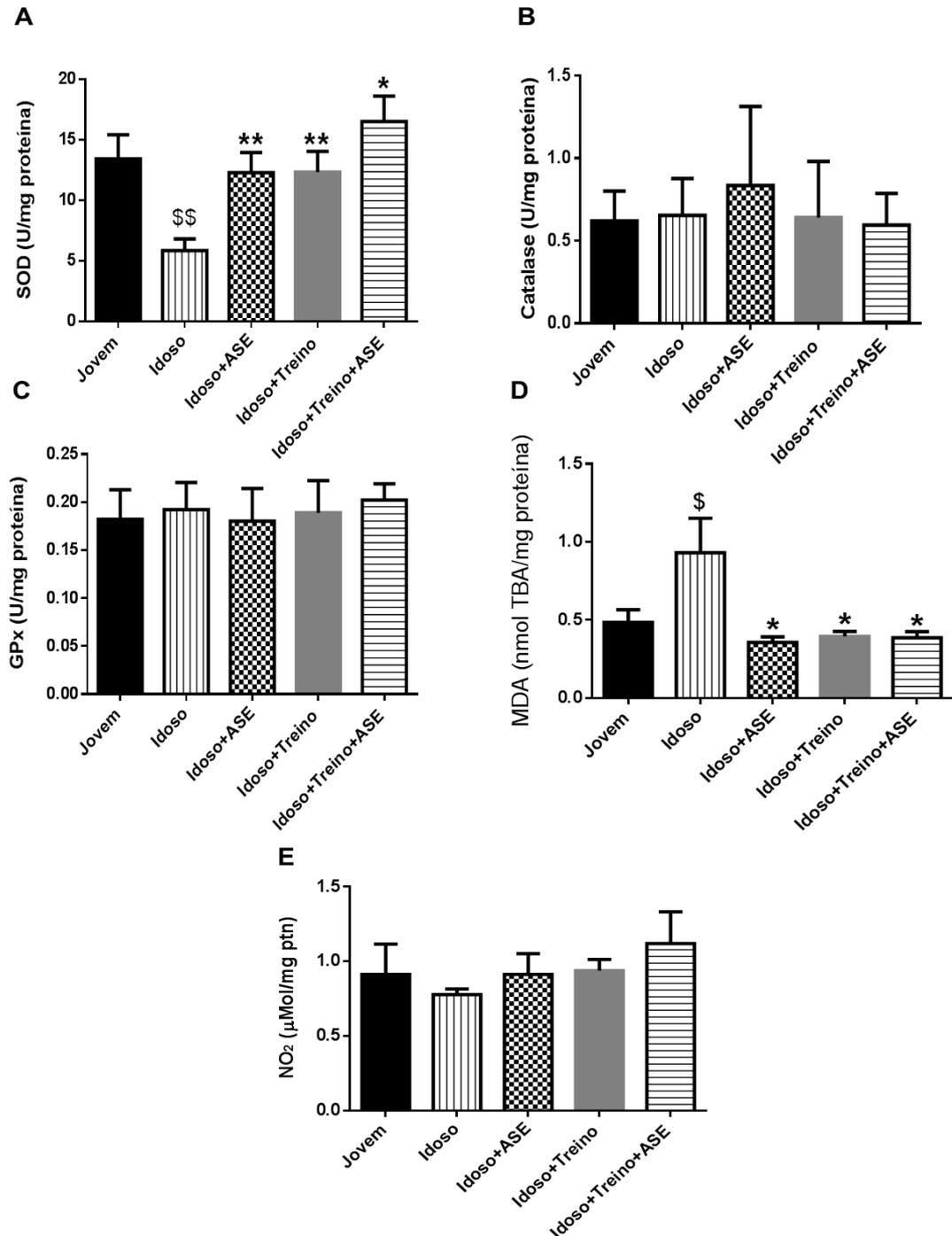
Fonte: O autor, 2021.

### **3.22 Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a atividade enzimática antioxidante, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato de hipocampo**

A atividade da enzima SOD foi menor ( $p < 0,05$ ) em amostras de homogenato de hipocampo do grupo Idoso comparado ao grupo Jovem, enquanto, as amostras dos grupos Idoso+ASE, Idoso+Treino e Idoso+Treino+ASE apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) comparado ao grupo Idoso (Figura 31A). Não foi observada diferença significativa na atividade das enzimas catalase e glutathione peroxidase nos diferentes grupos estudados (Figura 31B e 31C).

As amostras do grupo Idoso apresentaram um aumento significativo da formação de subprodutos (malondialdeído-MDA) da peroxidação lipídica comparado ao grupo Jovem. Os tratamentos com ASE, treinamento físico crônico isolado e a associação de ambos reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis de MDA em relação ao grupo Idoso (Figura 31E). Entretanto, não encontramos diferença significativa nos níveis de nitrito entre os diferentes grupos estudados em amostras de homogenato de hipocampo (Figura 31D).

Figura 31 – Efeito da idade, do tratamento com ASE e do exercício físico sobre a atividade enzimática, o dano oxidativo e o nível de nitrito em homogenato de hipocampo



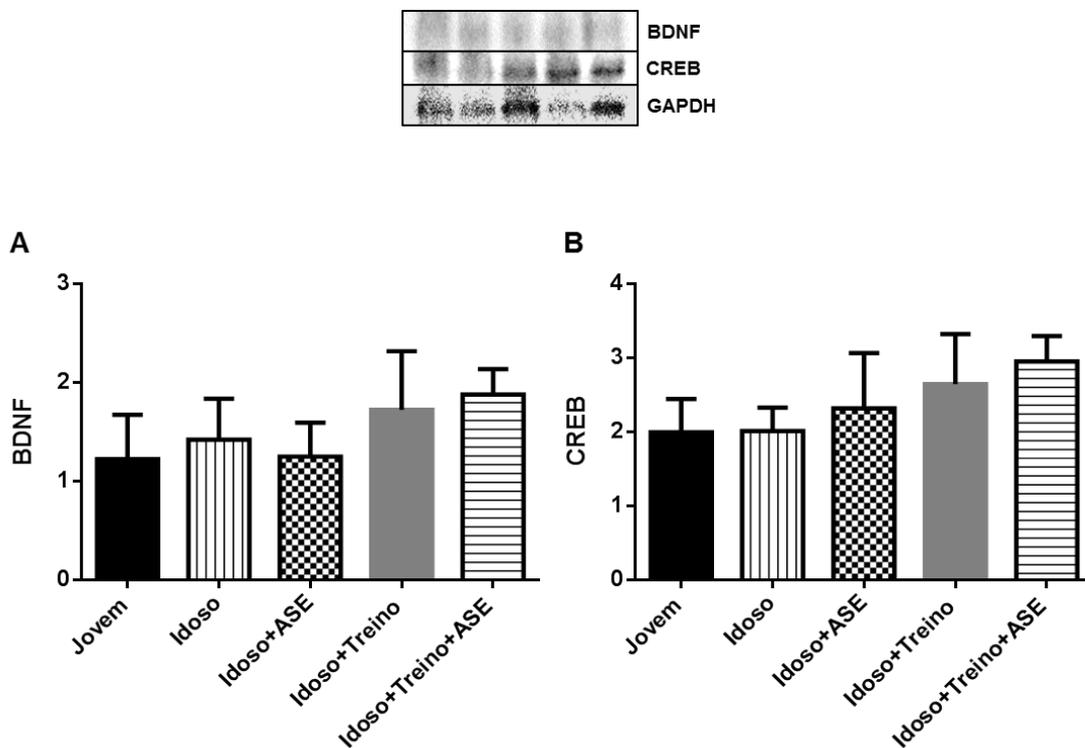
Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média, n=8 por grupo. \$ (p<0,05) em relação ao grupo Jovem; \* (p<0,05) em relação ao grupo Idoso, conforme determinado pelo método *one-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. \$\$ (p<0,05) em relação ao grupo Jovem \*\* (p<0,05) em relação ao grupo Idoso, conforme determinado pelo Teste-T não pareado.

Fonte: O autor, 2021.

### 3.23 Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão de CREB e BDNF em homogenato de hipocampo

Não houve diferença significativa nos níveis de marcadores de memória e aprendizagem, BDNF (Figura 32A) e CREB (Figura 32B) nos diferentes grupos estudados.

Figura 32 - Efeito da idade, do tratamento com ASE e do treinamento físico sobre a expressão de CREB e BDNF em homogenato de hipocampo



Nota: Os valores estão expressos em média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=3$  por grupo. *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey.

Fonte: O autor, 2021.

## 4 DISCUSSÃO

Recentemente, em um estudo publicado pelo nosso grupo com ratos jovens saudáveis (3 meses), demonstramos que a associação do exercício aeróbico com o ASE promoveu ganhos no desempenho físico dos animais (De Andrade Soares et al., 2020). Em outro estudo também observamos que o ASE possui propriedades ansiolíticas sobre o modelo animal de separação materna única (De Bem et al., 2020), evidenciando pela primeira vez, que o extrato poderia atuar diretamente sobre o sistema nervoso central. De modo semelhante, demonstramos a positiva interação do ASE com o exercício físico aeróbico em modelo animal de diabetes mellitus tipo 2 (De Bem et al., 2018). A literatura nos mostra que uma nutrição adequada combinada com a prática regular de atividade física são amplamente recomendadas para auxiliar em um envelhecimento saudável (Klimóva et al. 2018). Com base nessas observações e nas propriedades do ASE já descritas, testamos a hipótese de que o extrato e a atividade física possam exercer um papel benéfico e protetor sobre o processo de envelhecimento vascular, cognitivo e uma possível melhora do desempenho físico em animais idosos.

No presente estudo, observamos que o peso corporal dos grupos idosos foi significativamente maior quando comparados ao grupo Jovem no início do tratamento. Contudo, ao final das 4 semanas de período experimental, não observamos diferença entre os demais grupos. Nesse aspecto, a idade teve um papel fundamental. Animais jovens se encontravam dentro da fase de crescimento durante o período experimental possibilitando, assim, um maior ganho de peso final. Já os animais idosos não apresentaram ganho de peso, apenas a manutenção ou leve redução do seu peso corporal final. Tanto a atividade física, como o tratamento com o ASE ou a associação de ambos não apresentaram nenhuma influência sobre o peso corporal dos animais idosos. O Exercício físico aeróbico é considerado uma excelente estratégia para o controle e manutenção do peso corporal (Donnelly et al. 2009; Jakicic et al. 2008). Estudos da literatura demonstram que o treinamento físico contínuo de duas horas/dia, durante oito semanas, produziu uma redução significativa no ganho de peso em ratos saudáveis (Martinez et al. 2017). Embora o exercício físico aeróbico se configure como uma importante ferramenta na perda ou controle de peso e ganho de massa corporal, a intensidade e o tempo da atividade, juntamente com a dieta também exercem um papel fundamental. Outros dados da literatura demonstram que

a associação do exercício físico de intensidade moderada com suplementação de polifenóis não provocam impactos significativos sobre o peso corporal de animais, tanto com o chá verde (Murase et al. 2006), quercetina (Casuso et al. 2013) ou o consumo de polifenóis presentes na maçã (Nakazato et al. 2007), o que corrobora com nossos resultados.

O envelhecimento promove o declínio do desempenho físico devido, em parte, ao processo de disfunção endotelial e estresse oxidativo que afeta diretamente a regulação do tônus vascular e a distribuição do fluxo sanguíneo para o músculo esquelético durante o exercício (Golbidi; Laher, 2013). A redução da função endotelial contribui para um menor fluxo sanguíneo muscular, o que implica no idoso em uma menor tolerância ao exercício físico (Trott, 2009). Durante o estresse induzido pelo exercício físico ocorre o aumento da demanda metabólica nos músculos esqueléticos, sendo que o fluxo sanguíneo deficiente poderia levar a fadiga muscular (Woessner et al., 2018). Diante deste cenário, estudos com polifenóis tem demonstrado que os mesmos podem promover ganhos ou evitar a perda de desempenho físico, e dentre eles estão, a quercetina, um flavonol encontrado em plantas (Nieman et al., 2010) e a catequina, um dos polifenóis também encontrados no ASE, que promove uma melhora no desempenho físico, por aumentar o volume máximo de oxigênio e a resistência ao exercício (Malaguti; Angeloni; Hrelia, 2013). O resveratrol, polifenol comumente encontrado na casca da uva, quando administrado de forma crônica e preventiva reduz os efeitos provocados pela disfunção endotelial, evitando a perda de desempenho físico em animais idosos (Dal-Ros et al., 2011).

Em nosso estudo, observamos um aumento tanto na distância percorrida quanto no tempo de exercício em animais idosos submetidos ao treinamento físico crônico, nos grupos Idoso+treino e Idoso+Treino+ASE quando comparados ao seus respectivos testes progressivos máximos iniciais. Além disso, ao compararmos os testes de esforço máximo final dos grupos Idoso+Treino e Idoso+Treino+ASE evidenciamos que os animais tratados com o ASE obtiveram um desempenho significativamente maior tanto na distância percorrida, como no tempo de exercício em relação aos animais não suplementados, sugerindo uma interação positiva entre o tratamento com ASE e o treino. Com base nessas evidências e nas mais diversas utilizações de polifenóis não só como potencializadores do desempenho físico, mas também como redutor da intolerância ao exercício na terceira idade, o uso do extrato

torna-se uma ferramenta atraente, entretanto os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente elucidados.

Um dos mecanismos pelos quais a suplementação crônica com ASE promove um ganho de *performance* parece ser através da via da biogênese mitocondrial, no músculo esquelético (De Andrade Soares et al., 2020). A biogênese mitocondrial pode ser definida como o crescimento e divisão de mitocôndrias a partir de outra pré-existente. O aumento do número de mitocôndrias contribui para a melhoria da função do músculo esquelético durante o exercício, aumentando a resposta a demanda energética. Neste contexto, a PGC1 $\alpha$  funciona como um regulador da transcrição de genes mitocondriais, desempenhando um papel fundamental sobre a biogênese mitocondrial, no músculo esquelético em resposta ao treinamento físico (Drake; Wilson; Yan, 2016). Além disso, dados da literatura demonstram que tanto a AMPK como a SIRT-1 atuam sobre a regulação da PGC-1 $\alpha$  (Hood et al., 2016; Tang, 2016). Sendo assim, o presente trabalho demonstrou que animais idosos treinados e cronicamente tratados com ASE tiveram um aumento significativo nos níveis de SIRT-1 e PGC-1 $\alpha$  no músculo esquelético, porém não da AMPK, indicando uma ativação da via de sinalização SIRT-1/PGC-1 $\alpha$  relacionada à biogênese mitocondrial, corroborando com dados prévios em animais jovens (De Andrade Soares et al., 2020).

A ultraestrutura do tecido muscular esquelético também revelou que aparentemente, a interação entre o exercício físico e o ASE promoveu um aumento do número de mitocôndrias e de suas cristas, inclusive, em relação ao animal Idoso+Treino. As mitocôndrias são fundamentais para manter a homeostase da energia do músculo esquelético para atender às demandas impostas por estresses fisiológicos ou fisiopatológicos. A disfunção mitocondrial do músculo tem sido implicada na patogênese de muitas doenças, incluindo distrofia muscular, atrofia, diabetes tipo 2 e sarcopenia relacionada ao envelhecimento (Gan et al., 2018). A elevação tanto do número de mitocôndrias, quanto da densidade de suas cristas pode aumentar a resistência do músculo esquelético ao exercício por meio de uma seleção mais adequada de reservas energéticas, retardando a exaustão das reservas de glicogênio endógeno e, por sua vez, a fadiga durante a atividade física prolongada, sendo um mecanismo para aumentar a potência metabólica sem restringir a função contrátil (Nielsen et al., 2017). Tais evidências, juntamente com o aumento da expressão da via de sinalização SIRT-1/PGC-1 $\alpha$  no músculo esquelético poderiam explicar a melhora no desempenho físico dos animais pertencentes ao grupo

Idoso+Treino+ASE em relação aos animais Idoso+Treino observado no presente estudo. Vale ressaltar que apenas a associação do treinamento físico com o tratamento com ASE aumentou a expressão das proteínas, sugerindo uma interação positiva de ambos na biogênese mitocondrial. A ultraestrutura também revelou que os animais Idosos que não realizaram treinamento físico apresentaram um aparente aumento de grânulos de glicogênio no músculo esquelético. A literatura têm demonstrado que o envelhecimento por si só não reduz os estoques de glicogênio muscular (Montori-Grau et al., 2009), embora a enzima glicogênio sintase, responsável pela síntese dos grânulos de glicogênio no músculo, frequentemente encontra-se reduzida pela idade (Consitt; Dudley; Saxena, 2019; Montori-Grau et al., 2009). Possivelmente, o uso do glicogênio como combustível energético durante o exercício físico pode ter depletado o seu estoque muscular, o que explicaria a diferença observada entre animais treinados e não treinados.

A modulação do fator de transcrição Nrf-2 é muito benéfica para o aumento dos compostos antioxidantes. O Nrf-2 é o principal regulador de oxidação transcricional celular que controla diretamente a concentração de SOD e Catalase (Wang et al, 2018). Tanto a atividade física (Vargas-mendoza et al., 2019) quanto o tratamento com ASE (De Andrade Soares et al., 2020; Soares et al., 2017) podem promover o aumento da sua expressão e das proteínas responsáveis por sua transcrição. Contudo, não observamos diferenças na expressão do Nrf-2 no músculo esquelético entre os demais grupos estudados. Um dos motivos para tal divergência com os dados de De Andrade Soares et al. (2020), pode estar na idade do modelo animal, uma vez que no presente trabalho utilizamos animais de 18 meses, em vez de animais jovens (3 meses), para o treinamento físico crônico. Outro fator relevante é o tempo mais curto de tratamento com ASE e atividade física, pois realizamos o protocolo de 4 semanas em vez de 5. Além disso, a frequência de testes de esforço máximo foi menor no presente estudo (2 testes ao todo), enquanto no estudo de De Andrade Soares et al. (2020) foram realizados 5 testes no total.

Embora não tenhamos observado diferença na expressão do Nrf-2, entre os grupos experimentais, no presente estudo demonstramos que a atividade da enzima antioxidante SOD está aumentada no músculo esquelético de animais treinados e tratados com ASE, bem como observamos uma maior produção de nitrito, uma medida indireta de ON. Mais uma vez, cabe ressaltar que apenas a associação do

treinamento físico com o tratamento com ASE aumentou essas medidas, sugerindo uma interação positiva de ambos, no músculo esquelético.

Esses resultados em conjunto sugerem o papel importante do tratamento com ASE e treinamento físico associados, em aumentar a defesa antioxidante, por meio do aumento da atividade da SOD e a biodisponibilidade de ON no músculo esquelético, o que pode melhorar o fluxo sanguíneo e evitar a fadiga, favorecendo um melhor desempenho no exercício aeróbio (Powers; Jackson, 2008). A geração de ON pelos polifenóis poderia ser uma explicação para uma possível ação vasodilatadora na microcirculação da maquinaria contrátil dos miócitos, no tecido muscular esquelético (Wadley; McConell, 2007). A capacidade do ASE em estimular a formação de ON em células endoteliais em cultura, via ativação da enzima eNOS foi demonstrada em estudos anteriores do nosso grupo (Rocha et al., 2007; Rocha *et al.*, 2008). Ainda nesse contexto, a presença do ON estimulado pelo ASE poderia auxiliar na manutenção da vasodilatação no músculo esquelético ativo, permitindo um melhor fluxo sanguíneo e difusão de oxigênio no tecido muscular (Remensnyder; Mitchell; Sarnoff, 1962; Roseguini et al., 2007).

No presente estudo não observamos diferenças significativas no nível de glicemia em jejum, entre os grupos estudados. O índice glicêmico é a presença da glicose na circulação sistêmica e sua posterior captação pelos tecidos periféricos, sendo que a elevação destes níveis em jejum é associada com desenvolvimento de patologias como o diabetes mellitus (Gross et al., 2002). O processo de envelhecimento promove mudanças corporais como aumento da gordura visceral e perda de massa muscular que levam à intolerância à glicose e aumento do risco de diabetes (Abdelhafiz; Sinclair, 2015). Evidências apontam que o exercício físico reduz os níveis glicêmicos em animais e humanos diabéticos, sendo altamente recomendado para os portadores dessa doença (Delavar; Heidarianpour, 2016; Grisé et al., 2016). A literatura também têm demonstrado as propriedades hipoglicemiantes de muitos compostos polifenólicos (Babu; Liu; Gilbert, 2013). Ademais, nosso grupo já demonstrou que o tratamento preventivo com o ASE reduz os níveis glicêmicos em modelo de síndrome metabólica, de maneira isolada (De oliveira et al., 2010, 2015) e de diabetes mellitus tipo 2 (De Bem et al. 2017, 2018), assim como em modelo de hipertensão associada ao diabetes (Cordeiro et al. 2017). No entanto, o fato de não observarmos alteração significativa na glicemia entre os grupos estudados se deve, possivelmente, ao fato de que os animais utilizados neste modelo experimental,

apesar da idade avançada, não possuem nenhuma anormalidade dos níveis glicêmicos, constatando que o exercício físico, o ASE ou a associação de ambos, mantiveram a normoglicemia destes animais.

No modelo experimental estudado não encontramos diferença significativa nos níveis de lactato sanguíneo entre os grupos submetidos ao teste de esforço máximo. A presença elevada do lactato no sangue pode ser considerada um dos fatores da fadiga muscular, pois é um subproduto da glicólise anaeróbica (Koho; Väihkönen; Pösö, 2002), onde alguns estudos sugerem que sua presença possa causar acidose muscular (Nalbandian; Takeda, 2016). Esse processo de produção de energia é fundamental nos momentos iniciais do exercício físico (Urso et al., 2013), porém, em exercícios físicos de intensidade moderada e longa duração, o metabolismo glicolítico aeróbio, onde o oxigênio é o aceptor final, é predominante (Silva et al, 2007). O envelhecimento acarreta uma redução da perfusão sanguínea no músculo esquelético em exercício propiciando um quadro de fadiga muscular nos idosos, durante a prática física (Trott et al. 2009). Embora o acúmulo de lactato seja um possível indicador do aumento da acidose, ambos não devem ser interpretados como causa e efeito (Robergs; Ghiasvand; Parker, 2004). Diversos sistemas do organismo, entre eles o sistema nervoso central, desencadeiam respostas para interromper a atividade, fazendo com que o limite fisiológico suportado pelo organismo não seja excedido e danos irreversíveis não sejam provocados (Lambert; St Clair Gibson; Noakes, 2005). Outras análises complementares como mensurar a atividade da enzima lactato desidrogenase (produtora de lactato) ou comparar os níveis de lactato antes e após o teste de esforço máximo poderiam auxiliar na melhor compreensão do papel do lactato em nosso protocolo experimental.

O envelhecimento provoca modificações estruturais nas artérias que eventualmente resultam em rigidez vascular, contribuindo para o aumento da resistência vascular periférica. Como consequência, alterações hemodinâmicas cardiovasculares resultam na elevação da pressão arterial observada com o avançar da idade (Battistoni et al., 2020). Estas evidências vão de encontro ao que observamos no corrente trabalho, onde os animais idosos apresentaram hipertrofia vascular e uma maior PAS e PAD em relação aos animais Jovens. Paralelamente, evidenciamos uma redução significativa da atividade da enzima SOD, acompanhada de uma diminuição dos níveis de nitrito, e aumento nos níveis de peroxidação lipídica, marcador de dano oxidativo, na aorta de animais idosos. A redução da defesa

antioxidante gera um desbalanço do estado oxidativo, favorecendo a formação de ERO. O estresse oxidativo gera compostos que iniciam uma série de reações em cadeia envolvendo radicais livres, que podem oxidar uma grande variedade de moléculas biológicas (Melchiorretto et al., 2020), incluindo o ON, um dos mais importantes vasodilatadores, reduzindo a sua biodisponibilidade (Radi, 2018).

A literatura científica tem demonstrado que o envelhecimento reduz a resposta vascular à substâncias vasodilatadoras, tanto em modelos animais (Seals et al., 2014) quanto em humanos (Han et al. 2018), uma vez que tais respostas são dependentes do endotélio funcional. Um dos principais mecanismos sugeridos para a redução dessa resposta é a disfunção endotelial que normalmente acomete indivíduos de mais idade (Seals et al., 2014), o que também observamos no presente estudo, através da reatividade vascular à substâncias vasoativas. A ACh é um vasodilatador dependente de endotélio (Furchgott e Zawadzki. 1980). Observamos que o envelhecimento produziu uma resposta vascular reduzida desse agonista muscarínico, tanto em anel de aorta como em LAM, indicando um possível quadro de disfunção endotelial, não só em grandes artérias, como em vasos de resistência, resultando numa redução sistêmica da função endotelial induzida pela idade.

Sullivan et al., 2004 já haviam demonstrado que ratos idosos exibiram uma resposta vascular mais potente à fenilefrina, um agonista  $\alpha_1$  adrenérgico, quando comparada aos animais mais jovens em artéria mesentérica. Nossos resultados demonstraram que o LAM exibiu uma hiper-reatividade à norepinefrina em doses mais altas nos animais idosos. A resposta vasoconstritora da norepinefrina é mediada por receptores adrenérgicos que desencadeiam uma cascata de eventos, na qual ocorre aumento dos níveis de cálcio intracelular e a consequente ativação da maquinaria contrátil da célula muscular lisa (Zang et al., 2006). Devine; Somlyo, 1972 observaram que o aumento inicial do cálcio era derivado de um estoque no meio intracelular, o retículo sarcoplasmático, responsável pelo componente fásico da contração. Morgan & Campbell, (1985) demonstraram que a manutenção da contração induzida pela norepinefrina era dependente em parte do influxo de cálcio oriundo do meio externo, responsável pela fase tônica da contração. Esta fase é dependente da abertura de canais de cálcio dependente de voltagem ou operados por receptor (Nelson et al., 1988).

Ademais, também observamos um aumento da espessura da camada média da aorta induzida pela idade. Dados da literatura demonstram que o remodelamento

vascular na artéria aorta relacionada à idade ocorre com redução dos níveis de elastina e aumento da deposição de colágeno (Xu et al., 2017), que contribuem para o espessamento e o enrijecimento da aorta, estando intimamente ligados ao aumento da pressão arterial sistólica (Xu et al., 2017). Além disso, a redução da defesa antioxidante e aumento do dano oxidativo, possivelmente favoreceu a redução da biodisponibilidade de ON, e a disfunção endotelial vascular. Ao mesmo tempo, observamos uma resposta vasodilatadora diminuída à ACh e exacerbação da resposta vasoconstrictora, tanto na aorta como em artérias de resistência que juntamente ao espessamento da camada média da aorta, estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de ON, presumivelmente contribuíram para a elevação da pressão arterial observada em animais idosos.

Tanto os tratamentos isolados com ASE e exercício físico moderado quanto a associação de ambos, resultaram em uma redução significativa nos níveis pressóricos da PA ao final do período experimental, demonstrando pela primeira vez a capacidade anti-hipertensiva do extrato em modelo de animais idosos. Tais propriedades do ASE já haviam sido observadas em modelos animais de hipertensão (Da Costa et al., 2012, 2017; Da Silva Cristino Cordeiro et al., 2015). Embora o tratamento com ASE e a atividade física tenham reduzido os níveis pressóricos neste modelo animal, ambos não tiveram nenhum impacto sobre a espessura da camada média. Já foi demonstrado em modelo animal de hipertensão renovascular que tanto o ASE (Da Costa et al., 2012), quanto o exercício físico (Oliveira et al., 2020) previnem alterações morfológicas da parede vascular. Por outro lado, nossos resultados em animais idosos indicam que a atividade hipotensora de ambas as estratégias, possivelmente está atrelada aos efeitos sobre a resposta vascular e a disfunção endotelial, sem necessariamente interferir com o remodelamento da aorta. O efeito anti-hipertensivo do ASE, rico em polifenóis, é promovido em grande parte por vasodilatação dependente de endotélio induzida pelo extrato, principalmente em LAM, vasos de resistência vascular, mediado por ON em combinação com o fator de hiperpolarização dependente do endotélio (EDHF) (Rocha et al. 2007, Rocha et al. 2008). Evidências em humanos e modelos animais sugerem que o aumento da biodisponibilidade de ON e a redução dos níveis de estresse oxidativo sejam possíveis mecanismos benéficos da prática do exercício físico regular sobre o envelhecimento vascular (Durrant et al., 2009; Eskurza et al., 2004; Taddei et al., 2000). Neste contexto, o tratamento com o extrato e o exercício físico promoveram uma elevação da atividade da enzima SOD,

com redução dos níveis de MDA e aumento da biodisponibilidade de ON, em artéria aorta de animais idosos. O efeito antioxidante do ASE já foi demonstrado anteriormente em modelo de hipertensão (Da Costa et al., 2012; Rocha et al., 2008), mas também em associação com treino físico em animais jovens saudáveis (De Andrade Soares et al., 2020).

No corrente trabalho, demonstramos pela primeira vez que o tratamento com ASE produziu uma melhora da resposta vasodilatadora dependente de endotélio, em anel de aorta de animais idosos, sugerindo uma melhora da função endotelial. Apesar da melhora da reatividade à ACh não ter sido igualmente expressiva em LAM, a reatividade à NE foi significativamente reduzida neste território de resistência vascular. O aumento da reatividade à ACh em animais idosos tratados com ASE deve-se provavelmente aos fatores relaxantes derivados do endotélio, ON e EDHF, liberados pelo ASE, como previamente descrito em LAM e células endoteliais em cultura (Rocha et al. 2007; 2008). A ação antioxidante do ASE (Rocha et al. 2008; Oliveira et al. 2010; Moura et al. 2012; da Costa et al. 2012; de Bem et al. 2014), também deve contribuir para esse efeito benéfico na reatividade à ACh em aorta de animais idosos, já que proporciona o aumento da biodisponibilidade do ON, exercendo um efeito protetor contra a disfunção endotelial induzida pelo envelhecimento.

Outro achado relevante em nosso estudo foi o fato de que o exercício físico moderado isoladamente promoveu um aumento na resposta vasodilatadora induzida pela ACh em anel de aorta, de forma semelhante ao ASE. Como mencionado anteriormente, apesar da melhora da reatividade à ACh pelo ASE e exercício físico isoladamente não ter sido igualmente expressiva em LAM, a associação de ambos aumentou significativamente a resposta vasodilatadora da ACh, sugerindo um sinergismo entre o tratamento com ASE e exercício, resultando na melhora da função endotelial, o que pode ser correlacionado com uma reduzida reatividade à NE, neste território de resistência vascular. Cabe ressaltar que em ambos os vasos, as curvas concentração/dose-efeito à ACh e NE, dos grupos idosos tratados com ASE e exercício físico isoladamente ou em associação, foram semelhantes as do grupo de animais jovens sugerindo uma correção na diferença de reatividade aos agonistas entre jovens e idosos. O ON é o principal fator de relaxamento em grandes artérias de condutância como a aorta (Matoba et al., 2000). Contudo a dilatação de artérias de resistência, como no caso do LAM, é amplamente mediado pelo EDHF (Matoba et al., 2000). Como mencionado anteriormente, tanto o ASE como o exercício físico

possuem um efeito positivo sobre a biodisponibilidade de ON (Eskurza et al., 2004; Rocha et al., 2007; Taddei et al., 2000). Este fato pode explicar a maior resposta vasodilatadora da ACh em anéis de aorta do que em LAM de animais idosos tratados com ASE ou do grupo Treino. Embora parte da ação vasodilatadora induzida pelo extrato seja mediada por EDHF, o tratamento isoladamente exibiu baixo impacto sobre a dilatação induzida por ACh em LAM. Mais estudos são necessários para a melhor compreensão do sinergismo do ASE com a atividade física e a relação de ambos sobre o EDHF, possível mediador da melhora da função endotelial em LAM de animais idosos.

Também foi observado no presente estudo que a expressão das proteínas PI3K-AKT que atuam na fosforilação e ativação da eNOS não foram alteradas entre os grupos em homogenato de LAM e da artéria aorta. O aumento da eNOS após o exercício físico tem sido reportado na literatura (McAllister; Price, 2010). Contudo, o aumento da expressão da enzima não corresponde necessariamente a uma maior produção de ON (Fulton; Gratton; Sessa, 2001). Como já mencionado, a ação do ASE é dependente de endotélio pela produção de ON (Rocha et al. 2007). No entanto, os mecanismos que levam o extrato a aumentar a biodisponibilidade de ON ainda não estão elucidados, podendo ser atribuída em parte à sua ação antioxidante. Sendo assim, outros mecanismos de modulação da eNOS poderiam influenciar na sua eficácia sem necessariamente aumentar sua expressão (Fulton; Gratton; Sessa, 2001). Portanto, nosso estudo reforça que o processo de envelhecimento reduz a reatividade vascular dependente de endotélio induzida por ACh, bem como eleva a resposta vasoconstritora induzida por NE. Também observamos que o exercício físico e o ASE exercem uma modulação vascular positiva sobre a aorta e o LAM.

O fornecimento sanguíneo adequado é um fator decisivo para preservar a função de qualquer região cerebral. Alterações na microcirculação do hipocampo durante a hipertensão crônica podem potencializar o comprometimento cognitivo (Johnson; Miller; Cipolla, 2020), uma vez que esta estrutura cerebral é sensível ao elevado risco vascular e apresenta um encolhimento acelerado relacionado à idade em pessoas com hipertensão (Perosa et al., 2020). Disfunções vasculares juntamente com a hipoperfusão hipocampal promovem déficit de memória em ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (Johnson; Miller; Cipolla, 2020). É importante ressaltar que o diabetes mellitus, a hipertensão, a hiperlipidemia e a obesidade

contribuem não apenas para a demência vascular, mas também para o risco de demência neurodegenerativa (Ahlskog et al., 2011).

Neste contexto, diante dos resultados benéficos cardiovasculares do exercício físico e do ASE encontrados no presente estudo, investigamos a possível influência de ambos sobre o declínio cognitivo de ratos idosos, através do teste de esQUIVA passiva inibitória. Nossos resultados demonstraram que a idade avançada produziu uma deficiência de desempenho na memória aversiva de longo prazo quando comparamos com animais mais jovens. Corroborando estes achados, a literatura têm demonstrado que ratos Wistar já na meia idade (12 meses), bem como no período de vida mais avançado (20 meses) têm um desempenho deficitário no teste de esQUIVA passiva comparado aos animais jovens em testes realizados 24 horas após a sessão de treino (De Meireles et al., 2016; Moretti et al., 2011), reforçando que o processo de envelhecimento, por si só produz um déficit sobre a memória aversiva, principalmente de longo prazo.

Também foi observado que animais idosos tratados com ASE ou submetidos ao exercício físico moderado isoladamente preveniram o declínio cognitivo induzido pela idade. Pela primeira vez, demonstramos que a associação de ambos os tratamentos reverteu de modo significativo o déficit da resposta inibitória de longo prazo. É sabido que a prática de atividade física moderada é uma excelente estratégia não farmacológica para prevenir ou tratar o declínio cognitivo induzido pelo envelhecimento (Klímová; Vališ, 2018). Diversas hipóteses atuais tentam explicar os efeitos benéficos do exercício físico sobre o sistema nervoso central (SNC), entre elas estão o estudo de alterações nas neurotrofinas, modulação dos sistemas de neurotransmissores e alterações vasculares (Pietrelli et al., 2018). Ultimamente, a literatura têm lançado luz sobre a influência do exercício físico na produção da irisina, um hormônio formado através da clivagem do domínio de fibronectina tipo III contendo 5 (FNDC5), uma proteína precursora transmembrana expressa no músculo esquelético sob o controle da PGC-1 $\alpha$  (Lourenco et al., 2019; Matsuo et al., 2015). A literatura também demonstrou que a Irisina estimula a produção de BDNF no hipocampo, sendo este, um dos mecanismos pelos quais a atividade física exerce um efeito benéfico sobre o comprometimento cognitivo (Lourenco et al., 2019). O BDNF é uma neurotrofina amplamente expressa no SNC, que possui um papel crítico sobre a neurogênese hipocampal, a neuroplasticidade, a modelagem neuronal e a sobrevivência celular. A maior taxa de síntese de BDNF ocorre em neurônios

hipocampais e corticais, em paralelo com a distribuição de seu receptor tirosina-quinase B (TrkB) (Pietrelli et al., 2018). Recentemente, demonstramos que o ASE aumentou a expressão deste receptor no hipocampo, o que pode levar a maior ativação da via BDNF-TrkB, mesmo em condições reduzidas de BDNF (De Bem et al., 2020). Esta poderia ser uma das possíveis explicações para o resultado encontrado no presente estudo, uma vez que não observamos diferenças significativas nos níveis de CREB e BDNF entre os demais grupos estudados. Apesar do tratamento com o ASE e o exercício físico não terem alterado a expressão de CREB e BDNF, é importante ressaltar que os animais do grupo idoso não apresentaram redução nos níveis de ambos em relação aos animais mais jovens, indicando que o déficit cognitivo observado no teste de esQUIVA passiva esteja atrelado a outras vias.

Embora a plasticidade neural seja altamente relevante para a melhora do desempenho cognitivo, estudos têm apontado que o estresse oxidativo é um fator inicial no processo da doença de Alzheimer e que os antioxidantes têm minimizado seus efeitos deletérios (Veurink; Perry; Singh, 2020). Evidências da literatura demonstram que a suplementação de ratos idosos com a polpa do açaí melhorou a performance cognitiva no labirinto aquático de Morris, regulando o estresse oxidativo e a neuroinflamação crônica oriundas do envelhecimento (Poulose et al., 2017). Dietas enriquecidas com açaí modulam a expressão de Nrf2 tanto no hipocampo quanto no córtex frontal ativando, desse modo, a transcrição gênica de diversos fatores que promovem o aumento de enzimas antioxidantes endógenas, entre elas a SOD (Poulose et al., 2017). Ademais, o aumento das enzimas antioxidantes no tronco cerebral também foi relatado previamente com o uso do ASE (De Bem et al., 2020). Em concordância com estas evidências, observamos no atual estudo, que a atividade da SOD encontra-se reduzida, bem como os níveis de MDA estão elevados no hipocampo de animais idosos. Os tratamentos com ASE, exercício físico e a combinação entre eles proporcionaram um aumento na atividade da enzima, com consequente redução dos níveis de peroxidação lipídica. A literatura demonstra que os níveis teciduais de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica aumentam com a idade (Santos et al., 2013), principalmente devido ao desbalanço oxidativo, proporcionando o aumento na produção do radical superóxido no hipocampo de camundongos (Ali et al., 2006; Hu et al., 2006), de modo que a elevação nos níveis de MDA no hipocampo está associada com a redução do desempenho cognitivo (Heidari; Mehri; Hosseinzadeh, 2017). É sabido que os compostos fenólicos possuem a

capacidade de neutralizar as espécies reativas, doando um elétron ou um átomo de hidrogênio (Goupy et al., 2018). É creditado ao exercício físico, por sua vez, a ativação subsequente de enzimas antioxidantes via PGC-1 $\alpha$ , aumentando a resistência do hipocampo aos insultos oxidativos acumulados ao longo prazo (Marosi et al., 2012). Possivelmente o exercício físico e o ASE exerceram seu efeito benéfico através da modulação do estresse oxidativo. Mais estudos são necessários para a melhor elucidação do efeito benéfico do sinergismo de ambos sobre o déficit cognitivo induzido pela idade.

## CONCLUSÃO

Neste estudo demonstramos uma interação positiva do tratamento com o ASE e a atividade física aeróbica sobre a *performance* física reduzida, disfunção vascular e déficit cognitivo associados ao envelhecimento. A associação do tratamento com ASE e o exercício foi superior na melhora dos parâmetros avaliados, comparada as duas estratégias isoladamente. Nossos resultados sugerem que a propriedade do ASE em potencializar o desempenho físico de ratos Wistar idosos, deve envolver a melhora da função vascular, redução da pressão arterial, melhora do estado oxidativo vascular e muscular e uma regulação positiva das proteínas-chave da biogênese mitocondrial no músculo esquelético, o que deve contribuir para a tolerância ao exercício no envelhecimento. Também observamos o seu sinergismo com o exercício físico sobre o declínio cognitivo que ocorre com o avançar da idade, possivelmente devido a ação vasodilatadora e antioxidante do extrato. Portanto, sugerimos que a associação da suplementação com ASE e a prática do exercício físico é benéfica no envelhecimento, pois reduz o risco cardiovascular e promove ação neuroprotetora.

## REFERÊNCIAS

- AEBI. [13] **Catalase in vitro - ScienceDirect**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687984050163?via%3Dihub>>. Acesso em: 8 nov. 2021.
- AHLSKOG, J. E. et al. Physical Exercise as a Preventive or Disease-Modifying Treatment of Dementia and Brain Aging. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 9, p. 876–884, set. 2011.
- ALI, S. S. et al. Gender differences in free radical homeostasis during aging: shorter-lived female C57BL6 mice have increased oxidative stress. **Aging Cell**, v. 5, n. 6, p. 565–574, dez. 2006.
- AMIDFAR, M. et al. The role of CREB and BDNF in neurobiology and treatment of Alzheimer's disease. **Life Sciences**, v. 257, p. 118020, 15 set. 2020.
- ANDRIANTSITOHAINA, R. et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. **The British Journal of Nutrition**, v. 108, n. 9, p. 1532–1549, 14 nov. 2012.
- BAILEY, S. J. et al. Dietary nitrate supplementation reduces the O<sub>2</sub> cost of low-intensity exercise and enhances tolerance to high-intensity exercise in humans. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 107, n. 4, p. 1144–1155, out. 2009.
- BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. **Methods of Biochemical Analysis**, v. 32, p. 279–312, 1987.
- BARNES, J. N. Exercise, cognitive function, and aging. **Advances in Physiology Education**, v. 39, n. 2, p. 55–62, jun. 2015.
- BARTON, M. et al. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 30, n. 4, p. 817–824, out. 1997.
- BATTISTONI, A. et al. Vascular Aging and Central Aortic Blood Pressure: From Pathophysiology to Treatment. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention: The Official Journal of the Italian Society of Hypertension**, v. 27, n. 4, p. 299–308, ago. 2020a.
- BATTISTONI, A. et al. Vascular Aging and Central Aortic Blood Pressure: From Pathophysiology to Treatment. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention: The Official Journal of the Italian Society of Hypertension**, v. 27, n. 4, p. 299–308, ago. 2020b.
- BOBBIO, F. O. et al. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea*) Mart. **Food Science and Technology**, v. 20, p. 388–390, dez. 2000.
- CABELLO-VERRUGIO, C. et al. Oxidative Stress in Disease and Aging: Mechanisms and Therapies 2016. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 4310469, 2017.

CALIMPORT, S. R. G.; BENTLEY, B. L. Aging Classified as a Cause of Disease in ICD-11. **Rejuvenation Research**, v. 22, n. 4, p. 281–281, ago. 2019a.

CALIMPORT, S. R. G.; BENTLEY, B. L. Aging Classified as a Cause of Disease in ICD-11. **Rejuvenation Research**, v. 22, n. 4, p. 281, ago. 2019b.

CAREY, A. N. et al. Dietary supplementation with the polyphenol-rich açai pulps (*Euterpe oleracea* Mart. and *Euterpe precatoria* Mart.) improves cognition in aged rats and attenuates inflammatory signaling in BV-2 microglial cells. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 238–245, maio 2017.

CASUSO, R. A. et al. Ergogenic effects of quercetin supplementation in trained rats. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 10, p. 3, 14 jan. 2013.

CEHELLA, J. L. et al. Neuroprotective Benefits of Aerobic Exercise and Organoselenium Dietary Supplementation in Hippocampus of Old Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 5, p. 3832–3840, maio 2018.

CIVINSKI, C.; MONTIBELLER, A. A IMPORTÂNCIA DO EXERCÍCIO FÍSICO NO ENVELHECIMENTO. p. 13, 2011.

CLEMENTE, R.; RIBEIRO-FILHO, S. Comprometimento cognitivo leve: aspectos conceituais, abordagem clínica e diagnóstica. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 7, n. 1, 2008.

CONAB. Conab - Histórico Mensal Açai. 2019.

CONSITT, L. A.; DUDLEY, C.; SAXENA, G. Impact of Endurance and Resistance Training on Skeletal Muscle Glucose Metabolism in Older Adults. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2636, 3 nov. 2019.

CORDEIRO, L. M. S. et al. Physical exercise-induced fatigue: the role of serotonergic and dopaminergic systems. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 50, n. 12, p. e6432, 19 out. 2017.

CSISZAR, A. Anti-inflammatory effects of resveratrol: possible role in prevention of age-related cardiovascular disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1215, p. 117–122, jan. 2011.

DA COSTA, C. A. et al. *Euterpe oleracea* Mart.-derived polyphenols prevent endothelial dysfunction and vascular structural changes in renovascular hypertensive rats: role of oxidative stress. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 385, n. 12, p. 1199–1209, dez. 2012.

DAL-ROS, S. et al. Chronic intake of red wine polyphenols by young rats prevents aging-induced endothelial dysfunction and decline in physical performance: role of NADPH oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 404, n. 2, p. 743–749, 14 jan. 2011.

DE ANDRADE SOARES, R. et al. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) seed extract improves aerobic exercise performance in rats. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 136, p. 109549, out. 2020.

DE BEM, G. F. et al. Protective effect of Euterpe oleracea Mart (açai) extract on programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during pregnancy. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 9, p. 1328–1338, set. 2014.

DE BEM, G. F. et al. Euterpe oleracea Mart. (açai) seed extract associated with exercise training reduces hepatic steatosis in type 2 diabetic male rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 52, p. 70–81, fev. 2018.

DE BEM, G. F. et al. Anxiolytic and antioxidant effects of Euterpe oleracea Mart. (açai) seed extract in adult rat offspring submitted to periodic maternal separation. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism = Physiologie Appliquee, Nutrition Et Metabolisme**, v. 45, n. 11, p. 1277–1286, nov. 2020.

DE LA FUENTE, M.; GIMENEZ-LLORT, L. Models of aging of neuroimmunomodulation: strategies for its improvement. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 213–216, 2010.

DE MEIRELES, L. C. F. et al. Treadmill exercise induces selective changes in hippocampal histone acetylation during the aging process in rats. **Neuroscience Letters**, v. 634, p. 19–24, 10 nov. 2016.

DE OLIVEIRA, P. R. B. et al. Effects of an extract obtained from fruits of Euterpe oleracea Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 619–626, dez. 2010.

DE OLIVEIRA, P. R. B. et al. Euterpe oleracea Mart.-Derived Polyphenols Protect Mice from Diet-Induced Obesity and Fatty Liver by Regulating Hepatic Lipogenesis and Cholesterol Excretion. **PloS One**, v. 10, n. 12, p. e0143721, 2015.

DE SOUSA, C. V. et al. The Antioxidant Effect of Exercise: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Sports Medicine (Auckland, N.Z.)**, v. 47, n. 2, p. 277–293, fev. 2017.

DEVINE, C. E.; SOMLYO, A. V.; SOMLYO, A. P. Sarcoplasmic reticulum and excitation-contraction coupling in mammalian smooth muscles. **The Journal of Cell Biology**, v. 52, n. 3, p. 690–718, mar. 1972.

DIEESE. **DIEESE - 2021**. Disponível em: <<https://www.dieese.org.br/outraspublicacoes/2021/graficoPerfil60AnosMais.html>>. Acesso em: 3 nov. 2021.

DRAKE, J. C.; WILSON, R. J.; YAN, Z. Molecular mechanisms for mitochondrial adaptation to exercise training in skeletal muscle. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 30, n. 1, p. 13–22, jan. 2016.

DURRANT, J. R. et al. Voluntary wheel running restores endothelial function in conduit arteries of old mice: direct evidence for reduced oxidative stress, increased superoxide dismutase activity and down-regulation of NADPH oxidase. **The Journal of Physiology**, v. 587, n. Pt 13, p. 3271–3285, 1 jul. 2009.

- DUZEL, E.; VAN PRAAG, H.; SENDTNER, M. Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function? **Brain: A Journal of Neurology**, v. 139, n. Pt 3, p. 662–673, mar. 2016.
- ESKURZA, I. et al. Ascorbic acid does not affect large elastic artery compliance or central blood pressure in young and older men. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, n. 4, p. H1528-1534, abr. 2004.
- FERNANDO, W. M. A. D. B. et al. Diabetes and Alzheimer's Disease: Can Tea Phytochemicals Play a Role in Prevention? **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 59, n. 2, p. 481–501, 2017.
- FILLIT, H.; GREEN, A. Aducanumab and the FDA - where are we now? **Nature Reviews. Neurology**, v. 17, n. 3, p. 129–130, mar. 2021.
- FLOHÉ E GUNZLER. **Assays of glutathione peroxidase - PubMed**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6727659/>>. Acesso em: 8 nov. 2021.
- FORNI, C. et al. Beneficial Role of Phytochemicals on Oxidative Stress and Age-Related Diseases. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 8748253, 2019.
- FORWOOD, S. E.; WINTERS, B. D.; BUSSEY, T. J. Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. **Hippocampus**, v. 15, n. 3, p. 347–355, 2005.
- FULTON, D.; GRATTON, J. P.; SESSA, W. C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, n. 3, p. 818–824, dez. 2001.
- FURCHGOTT E ZAWADZKI. **The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine | Nature**. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/288373a0>>. Acesso em: 7 nov. 2021.
- FURLAN, A. DA S.; RODRIGUES, L. CONSUMO DE POLIFENÓIS E SUA ASSOCIAÇÃO COM CONHECIMENTO NUTRICIONAL E ATIVIDADE FÍSICA. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 22, p. 461–464, dez. 2016.
- GAN, Z. et al. Skeletal muscle mitochondrial remodeling in exercise and diseases. **Cell Research**, v. 28, n. 10, p. 969–980, out. 2018.
- GOLBIDI, S.; LAHER, I. Exercise and the Aging Endothelium. **Journal of Diabetes Research**, v. 2013, p. 789607, 2013.
- GOUPY, P. et al. Carotenoids: Experimental Ionization Energies and Capacity at Inhibiting Lipid Peroxidation in a Chemical Model of Dietary Oxidative Stress. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 122, n. 22, p. 5860–5869, 7 jun. 2018.
- GRADINARU, D. et al. Oxidized LDL and NO synthesis--Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 151, p. 101–113, nov. 2015.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, out. 1982.

HAN, S. et al. The effects of resveratrol and exercise on age and gender-dependent alterations of vascular functions and biomarkers. **Experimental Gerontology**, v. 110, p. 191–201, set. 2018.

HARMAN. **Free Radical Theory of Aging: Inhibition of Amyloidosis in Mice by Antioxidants; Possible Mechanism\*** - HARMAN - 1976 - **Journal of the American Geriatrics Society - Wiley Online Library**. Disponível em: <<https://agsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1532-5415.1976.tb06780.x>>. Acesso em: 6 nov. 2021.

HARMAN, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**, v. 11, n. 3, p. 298–300, jul. 1956.

HART, N. et al. Resveratrol enhances exercise training responses in rats selectively bred for high running performance. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 61, p. 10.1016/j.fct.2013.01.051, nov. 2013.

HEIDARI, S.; MEHRI, S.; HOSSEINZADEH, H. Memory enhancement and protective effects of crocin against D-galactose aging model in the hippocampus of Wistar rats. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, n. 11, p. 1250–1259, nov. 2017.

HOOD, D. A. et al. Unravelling the mechanisms regulating muscle mitochondrial biogenesis. **The Biochemical Journal**, v. 473, n. 15, p. 2295–2314, 1 ago. 2016.

HOOSHMAND-MOGHADAM, B. et al. The effect of 12-week resistance exercise training on serum levels of cellular aging process parameters in elderly men. **Experimental Gerontology**, v. 141, p. 111090, nov. 2020.

HOSSEINI, R. et al. Modulation of ERK1/2 and Akt Pathways Involved in the Neurotrophic Action of Caffeic Acid Alkyl Esters. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 12, p. E3340, 17 dez. 2018.

HU, D. et al. Aging-dependent alterations in synaptic plasticity and memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 26, n. 15, p. 3933–3941, 12 abr. 2006.

IZQUIERDO, L. A. et al. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, n. 3, p. 269–287, jun. 2002.

JAKOVLJEVIC, D. G. Physical activity and cardiovascular aging: Physiological and molecular insights. **Experimental Gerontology**, v. 109, p. 67–74, ago. 2018.

JOHNSON, A. C.; MILLER, J. E.; CIPOLLA, M. J. Memory impairment in spontaneously hypertensive rats is associated with hippocampal hypoperfusion and hippocampal vascular dysfunction. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 40, n. 4, p. 845–859, abr. 2020.

- JOSEPH, A.; ADHIHETTY, P. J.; LEEUWENBURGH, C. Beneficial effects of exercise on age-related mitochondrial dysfunction and oxidative stress in skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 18, p. 5105–5123, 15 set. 2016.
- KHAN, Z. U. et al. Chapter One - Memory Deficits in Aging and Neurological Diseases. In: KHAN, Z. U.; MULY, E. C. (Eds.). . **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. Molecular Basis of Memory. [s.l.] Academic Press, 2014. v. 122p. 1–29.
- KHURANA, S. et al. Polyphenols: Benefits to the Cardiovascular System in Health and in Aging. **Nutrients**, v. 5, n. 10, p. 3779–3827, 26 set. 2013.
- KIM, Y.; TRIOLO, M.; HOOD, D. A. Impact of Aging and Exercise on Mitochondrial Quality Control in Skeletal Muscle. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 3165396, 2017.
- KLÍMOVÁ, B.; VALIŠ, M. Nutritional Interventions as Beneficial Strategies to Delay Cognitive Decline in Healthy Older Individuals. **Nutrients**, v. 10, n. 7, p. E905, 15 jul. 2018.
- KOVACIC, J. C. et al. Cellular senescence, vascular disease, and aging: Part 1 of a 2-part review. **Circulation**, v. 123, n. 15, p. 1650–1660, 19 abr. 2011.
- KREUZ, G.; FRANCO, M. H. P. O luto do idoso diante das perdas da doença e do envelhecimento - Revisão Sistemática de Literatura. **Arquivos Brasileiros de Psicologia**, v. 69, n. 2, p. 168–186, 2017.
- LI, H. et al. Resveratrol and Vascular Function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 9, p. E2155, 30 abr. 2019.
- LIAN, Q. et al. Effects of grape seed proanthocyanidin on Alzheimer's disease in vitro and in vivo. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 12, n. 3, p. 1681–1692, set. 2016.
- LIMA-COSTA, M. F. Aging and public health. **Revista de Saúde Pública**, v. 52, n. Suppl 2, p. 2s, 24 jan. 2019.
- LOURENCO, M. V. et al. Exercise-linked FNDC5/irisin rescues synaptic plasticity and memory defects in Alzheimer's models. **Nature medicine**, v. 25, n. 1, p. 165–175, jan. 2019.
- MALAGUTI, M.; ANGELONI, C.; HRELIA, S. Polyphenols in exercise performance and prevention of exercise-induced muscle damage. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 825928, 2013.
- MALOBERTI, A. et al. Vascular Aging and Disease of the Large Vessels: Role of Inflammation. **High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention: The Official Journal of the Italian Society of Hypertension**, v. 26, n. 3, p. 175–182, jun. 2019.
- MAROSI, K. et al. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. **Neuroscience**, v. 226, p. 21–28, 13 dez. 2012.

- MATHEUS, M. E. et al. Inhibitory effects of Euterpe oleracea Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 2, p. 291–296, 19 set. 2006.
- MATOBA, T. et al. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 12, p. 1521–1530, dez. 2000.
- MATSUO, Y. et al. Fibronectin type III domain containing 5 expression in skeletal muscle in chronic heart failure—relevance of inflammatory cytokines. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 6, n. 1, p. 62–72, mar. 2015.
- MATSUURA, C. et al. Exercise training in doxorubicin-induced heart failure: effects on the L-arginine-NO pathway and vascular reactivity. **Journal of the American Society of Hypertension: JASH**, v. 4, n. 1, p. 7–13, fev. 2010.
- MCALLISTER, R. M.; PRICE, E. M. Effects of exercise training on vasodilatory protein expression and activity in rats. **European Journal of Applied Physiology**, v. 110, n. 5, p. 1019–1027, nov. 2010.
- MCGURRAN, H. et al. Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease: Biological Mechanisms of Exercise. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 69, n. 2, p. 311–338, 2019.
- MELCHIORETTO, E. F. et al. Stereological study and analysis of oxidative stress during renal aging in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 35, n. 11, p. e351106, 2020.
- MIKAEL, L. DE R. et al. Envelhecimento Vascular e Rigidez Arterial. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 109, n. 3, p. 253–258, 21 jun. 2017.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Estatuto do idoso**. Brasil: Editora MS, 2009.
- MONTORI-GRAU, M. et al. Effects of aging and calorie restriction on rat skeletal muscle glycogen synthase and glycogen phosphorylase. **Experimental gerontology**, v. 44, n. 6–7, p. 426–433, 2009.
- MORETTI, M. et al. Emotional behavior in middle-aged rats: Implications for geriatric psychopathologies. **Physiology & Behavior**, v. 102, n. 1, p. 115–120, 10 jan. 2011.
- MOURA, R. S. DE et al. Effects of Euterpe oleracea Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytomedicine**, v. 19, n. 3–4, p. 262–269, 15 fev. 2012.
- MURAD, F. et al. Effects of nitrovasodilators, endothelium-dependent vasodilators, and atrial peptides on cGMP. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 53 Pt 2, p. 1005–1009, 1988.
- NATIONS, U. N. D. OF E. AND S. **World Population Ageing 2020: Highlights: Living Arrangements of Older Persons**. [s.l.] United Nations, 2021.
- NELSON, M. T. et al. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature**, v. 336, n. 6197, p. 382–385, 24 nov. 1988.

- NIELSEN, J. et al. Plasticity in mitochondrial cristae density allows metabolic capacity modulation in human skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, v. 595, n. 9, p. 2839–2847, 1 maio 2017.
- NIEMAN, D. C. et al. Quercetin's influence on exercise performance and muscle mitochondrial biogenesis. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 42, n. 2, p. 338–345, fev. 2010.
- NOGUEIRA, L. et al. (–)-Epicatechin enhances fatigue resistance and oxidative capacity in mouse muscle. **The Journal of Physiology**, v. 589, n. Pt 18, p. 4615–4631, 15 set. 2011.
- OLIVEIRA, P. R. DE et al. Exercise training attenuates angiotensin II-induced vasoconstriction in the aorta of normotensive but not hypertensive rats. **Experimental Physiology**, v. 105, n. 4, p. 732–742, abr. 2020.
- PEROSA, V. et al. Hippocampal vascular reserve associated with cognitive performance and hippocampal volume. **Brain**, v. 143, n. 2, p. 622–634, fev. 2020.
- PIETRELLI, A. et al. Aerobic exercise upregulates the BDNF-Serotonin systems and improves the cognitive function in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 155, p. 528–542, nov. 2018.
- POULOSE, S. M. et al. Anthocyanin-rich açai (*Euterpe oleracea* Mart.) fruit pulp fractions attenuate inflammatory stress signaling in mouse brain BV-2 microglial cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 1084–1093, 1 fev. 2012.
- POULOSE, S. M. et al. Modulation of oxidative stress, inflammation, autophagy and expression of Nrf2 in hippocampus and frontal cortex of rats fed with açai-enriched diets. **Nutritional Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 305–315, jun. 2017.
- POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1243–1276, out. 2008.
- RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 23, p. 5839–5848, 5 jun. 2018.
- RASBACH, K. A.; SCHNELLMANN, R. G. Isoflavones promote mitochondrial biogenesis. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 325, n. 2, p. 536–543, maio 2008.
- REMENTSNYDER, J. P.; MITCHELL, J. H.; SARNOFF, S. J. Functional sympatholysis during muscular activity. Observations on influence of carotid sinus on oxygen uptake. **Circulation Research**, v. 11, p. 370–380, set. 1962.
- RENDEIRO, C. et al. Blueberry supplementation induces spatial memory improvements and region-specific regulation of hippocampal BDNF mRNA expression in young rats. **Psychopharmacology**, v. 223, n. 3, p. 319–330, out. 2012.
- RESENDE, A. C.; BALLEJO, G.; SALGADO, M. C. Role of non-nitric oxide non-prostaglandin endothelium-derived relaxing factor(s) in bradykinin vasodilation.

**Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 31, n. 9, p. 1229–1235, set. 1998.

RICCIARELLI, R.; FEDELE, E. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. **Current Neuropharmacology**, v. 15, n. 6, p. 926–935, ago. 2017.

ROCHA, A. P. M. et al. Endothelium-dependent vasodilator effect of Euterpe oleracea Mart. (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. **Vascular Pharmacology**, v. 46, n. 2, p. 97–104, fev. 2007.

ROCHA ET AL. **Antihypertensive Effects and Antioxidant Action of a Hydro-Alcoholic Extract Obtained from Fruits of Euterpe oleracea Mart. (Acai)**. Disponível em: <<https://scialert.net/abstract/?doi=jpt.2008.435.448>>. Acesso em: 6 nov. 2021.

ROSEGUINI, B. T. et al. Muscle metaboreflex contribution to resting limb haemodynamic control is preserved in older subjects. **Clinical Physiology and Functional Imaging**, v. 27, n. 5, p. 335–339, set. 2007.

ROSSMAN, M. J. et al. Healthy lifestyle-based approaches for successful vascular aging. **Journal of Applied Physiology**, v. 125, n. 6, p. 1888–1900, 1 dez. 2018.

SALDMANN, F. et al. The Naked Mole Rat: A Unique Example of Positive Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 4502819, 2019.

SANFORD, A. M. Mild Cognitive Impairment. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 33, n. 3, p. 325–337, ago. 2017.

SANTOS, R. X. et al. Mitochondrial DNA oxidative damage and repair in aging and Alzheimer's disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 18, p. 2444–2457, 20 jun. 2013.

SBGG. **Velhice não é doença: quem sai ganhando com a nova classificação?** Disponível em: <<https://sbgg.org.br/velhice-nao-e-doenca-quem-sai-ganhando-com-a-nova-classificacao/>>. Acesso em: 6 nov. 2021a.

SBGG. **Aducanumab para Alzheimer**. Disponível em: <<https://sbgg.org.br/aducanumab-para-alzheimer/>>. Acesso em: 15 nov. 2021b.

SCHNEIDER E IRIGARAY. **SciELO - Brasil - O envelhecimento na atualidade: aspectos cronológicos, biológicos, psicológicos e sociais O envelhecimento na atualidade: aspectos cronológicos, biológicos, psicológicos e sociais**. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/estpsi/a/LTdtHbLvZPLZk8MtMNmZyb/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 4 nov. 2021.

SCHNEIDER, L. A resurrection of aducanumab for Alzheimer's disease. **The Lancet. Neurology**, v. 19, n. 2, p. 111–112, fev. 2020.

SCHVEITZER ET AL. A importância da atividade física durante o processo de envelhecimento. 2010.

SEALS, D. R. et al. You're only as old as your arteries: translational strategies for preserving vascular endothelial function with aging. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 29, n. 4, p. 250–264, jul. 2014.

SEALS, D. R.; ALEXANDER, L. M. Vascular aging. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 125, n. 6, p. 1841–1842, 1 dez. 2018.

SEALS, D. R.; NAGY, E. E.; MOREAU, K. L. Aerobic exercise training and vascular function with ageing in healthy men and women. **The Journal of Physiology**, v. 597, n. 19, p. 4901–4914, out. 2019.

SERINO, A.; SALAZAR, G. Protective Role of Polyphenols against Vascular Inflammation, Aging and Cardiovascular Disease. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. E53, 28 dez. 2018.

SIMI, S. L. S. **Alterações na ativação do CREB e nos níveis de BDNF induzidas pelo etanol em camundongos adolescentes e adultos.**

SINGLETON. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents – ScienceOpen**. Disponível em: <<https://www.scienceopen.com/document?vid=47ae9a36-bfad-4b12-b97d-4c8b4f75ebcd>>. Acesso em: 7 nov. 2021.

SIRAGUSA, M.; FLEMING, I. The eNOS signalosome and its link to endothelial dysfunction. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 468, n. 7, p. 1125–1137, jul. 2016.

SOARES, E. R. et al. Up-regulation of Nrf2-antioxidant signaling by Açaí (Euterpe oleracea Mart.) extract prevents oxidative stress in human endothelial cells. **Journal of Functional Foods**, v. 37, p. 107–115, 1 out. 2017.

SULLIVAN, J. C. et al. Age-related alterations in NOS and oxidative stress in mesenteric arteries from male and female rats. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 97, n. 4, p. 1268–1274, out. 2004.

TADDEI, S. et al. Physical activity prevents age-related impairment in nitric oxide availability in elderly athletes. **Circulation**, v. 101, n. 25, p. 2896–2901, 27 jun. 2000.

TANG, B. L. Sirt1 and the Mitochondria. **Molecules and Cells**, v. 39, n. 2, p. 87–95, fev. 2016.

TARE. **Hyperpolarization and relaxation of arterial smooth muscle caused by nitric oxide derived from the endothelium | Nature**. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/346069a0>>. Acesso em: 7 nov. 2021.

TAVARES, T. B. et al. Therapeutic effects of açaí seed extract on hepatic steatosis in high-fat diet-induced obesity in male mice: a comparative effect with rosuvastatin. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 12, p. 1921–1932, dez. 2020.

TESAURO, M. et al. Arterial ageing: from endothelial dysfunction to vascular calcification. **Journal of Internal Medicine**, v. 281, n. 5, p. 471–482, maio 2017.

TIWARI, S. et al. Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 5541–5554, 19 jul. 2019.

TROTT. **Exercise training reverses age-related decrements in endothelium-dependent dilation in skeletal muscle feed arteries - PubMed**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19299569/>>. Acesso em: 7 nov. 2021.

UNGVARI, Z. et al. Mechanisms of Vascular Aging. **Circulation Research**, v. 123, n. 7, p. 849–867, 14 set. 2018.

VARGAS-MENDOZA, N. et al. Antioxidant and Adaptative Response Mediated by Nrf2 during Physical Exercise. **Antioxidants**, v. 8, n. 6, p. 196, jun. 2019.

VATNER, S. F. et al. Healthful aging mediated by inhibition of oxidative stress. **Ageing Research Reviews**, v. 64, p. 101194, dez. 2020.

VEURINK, G.; PERRY, G.; SINGH, S. K. Role of antioxidants and a nutrient rich diet in Alzheimer's disease. **Open Biology**, v. 10, n. 6, p. 200084, 17 jun. 2020.

WADLEY, G. D.; MCCONELL, G. K. Effect of nitric oxide synthase inhibition on mitochondrial biogenesis in rat skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 102, n. 1, p. 314–320, jan. 2007.

WALKER, J. M. et al. Beneficial effects of dietary EGCG and voluntary exercise on behavior in an Alzheimer's disease mouse model. **Journal of Alzheimer's disease: JAD**, v. 44, n. 2, p. 561–572, 2015.

WANG ET AL. **Antifatigue Potential Activity of Sarcodon imbricatus in Acute Excise-Treated and Chronic Fatigue Syndrome in Mice via Regulation of Nrf2-Mediated Oxidative Stress - PubMed**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30050662/>>. Acesso em: 10 nov. 2021.

WHO. **World report on ageing and health**. [s.l.] World Health Organization, 2015.

WHO. **Physical activity**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/physical-activity>>. Acesso em: 7 nov. 2021.

WILLIAMS, C. et al. Blueberry-induced changes in spatial working memory correlate with changes in hippocampal CREB phosphorylation and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) levels. **Free radical biology & medicine**, v. 45, p. 295–305, 1 set. 2008.

WINTERS, B. D. et al. Double dissociation between the effects of peri-postrhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 26, p. 5901–5908, 30 jun. 2004.

WOESSNER, M. N. et al. Dietary nitrate supplementation in cardiovascular health: an ergogenic aid or exercise therapeutic? **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 314, n. 2, p. H195–H212, 1 fev. 2018.

XU, X. et al. Age-related Impairment of Vascular Structure and Functions. **Aging and Disease**, v. 8, n. 5, p. 590–610, 1 out. 2017.

ZANG, W. et al. Sympathetically evoked Ca<sup>2+</sup> signaling in arterial smooth muscle. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 12, p. 1515–1525, dez. 2006.

ZANICHELLI, P. G. et al. The [Ru(Hedta)NO](0.1-) system: structure, chemical reactivity and biological assays. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 11, p. 1921–1932, nov. 2004.

ZHAVORONKOV, A.; BHULLAR, B. Classifying aging as a disease in the context of ICD-11. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 326, 2015.

## ANEXO A - Comitê de ética



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO  
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DO EXTRATO DE EUTERPE OLERACEA MART. (AÇAÍ) E DO EXERCÍCIO FÍSICO SOBRE AS ALTERAÇÕES VASCULARES E DE MEMÓRIA OCACIONADAS PELO ENVELHECIMENTO", registrada com o nº 038/2017, sob a responsabilidade de **Angela de Castro Resende** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 25/09/2017.

Finalidade	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/09/2021
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	50
Peso/idade	300-450 g / 3 e 19 meses
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 26 de Setembro de 2017.

Prof. Dr. Alex C. Manhães  
Coordenador  
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patrícia C. Lisboa  
Vice-Coordenadora  
CEUA/IBRAG/UERJ

## ANEXO B - Petição de depósito de patente

26/06/2020 870200079656  
12:03

29409161920563821

## Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 013108 7

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 33540014000157

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: r. São Francisco Xavier, 524 - T-29 - bl F - Maracanã

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20550-013

País: Brasil

Telefone: (21) 2334-0017

Fax: (21) 2334-0018

Email: veras@uerj.br

### Dados do Pedido

---

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): USO DO EXTRATO DO CAROÇO DE AÇAÍ PARA TRATAMENTO DE ASTENIA ASSOCIADA AO ENVELHECIMENTO

Resumo: A presente invenção refere-se ao campo dos medicamentos e alimentos funcionais oriundos da biodiversidade. Mais especificamente, a presente invenção se refere ao uso do extrato do caroço de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) para produção de um alimento funcional ou para produção de um medicamento para tratar astenia associada ao envelhecimento.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 26/06/2020 às 12:03, Petição 870200079656