

MAÍRA FRIGO FLÔRES

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM CHÁ-VERDE
SOBRE CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS
ASSOCIADAS AO ENVELHECIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Pivetta Carpes

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Pâmela Billig Mello Carpes

Uruguaiana

2013

(Ficha catalográfica no verso)

MAÍRA FRIGO FLÔRES

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM CHÁ-VERDE
SOBRE CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS
ASSOCIADAS AO ENVELHECIMENTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Dissertação apresentada e defendida em 08 de novembro de 2013.

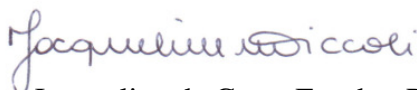
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Felipe Pivetta Carpes

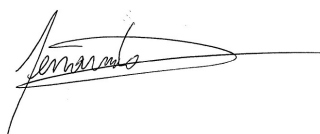
Orientador

UNIPAMPA



Prof. Dr. Jacqueline da Costa Escobar Piccoli

UNIPAMPA



Prof. Dr. Fernando Diefenthaler

UFSC

DEDICO

À minha família e professores,
pelo estímulo e exemplo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Felipe Pivetta Carpes, pela oportunidade dada, pelo empenho e comprometimento com o trabalho, por respeitar as particularidades das pessoas que com ele trabalham e pelo exemplo de profissional, a ser seguido. Ainda, agradeço aos professores que conosco trabalharam, especialmente às professoras Pâmela Carpes e Francielli Santos, pela disponibilidade e presteza, e aos colegas do meio acadêmico, especialmente à Helen Schimidt e Alexandre Martins, que contribuíram conosco, pessoalmente ou profissionalmente, nessa etapa.

Agradeço aos meus familiares, que relevaram e substituíram minhas ausências, na certeza de que essa é uma conquista coletiva. O amor que nos une traz a certeza de que juntos somos mais fortes, e mais longe iremos.

Ainda, agradeço a meus colegas de trabalho e clientes, que foram compreensíveis e acessíveis, entendendo as necessidades inerentes a esse projeto, e tornando possível a concretização desse sonho.

A Deus, agradeço a todas as realizações, sabendo que a força e vontade Dele tem participação fundamental na obtenção da felicidade.

APRESENTAÇÃO

Os resultados que compõem essa dissertação são parte do projeto de pesquisa com título “*Efeitos do exercício físico e da suplementação com chá-verde em características bioquímicas e comportamentais associadas ao envelhecimento*”, registrado junto à Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Pampa com protocolo de registro nº 10.0010.13 e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pampa com parecer de aprovação nº 042-2012. O capítulo da introdução apresenta um apanhado geral da temática do estudo e a identificação do problema de pesquisa, bem como sua relevância. Os métodos empregados, resultados e discussão dos achados, seguidos pela conclusão com base nos resultados obtidos nos experimentos desenvolvidos, compõe o capítulo I, apresentado no formato de artigo original, e que foi submetido para apreciação no periódico *Rejuvenation Research* (Qualis A2 na área CB II). Os itens discussão e conclusões, apresentados na parte final dessa dissertação (capítulo II), representam interpretações e comentários acerca dos resultados apresentados no artigo original supracitado. As referências bibliográficas são compostas apenas pelas citações pertencentes aos itens introdução, discussão e conclusão desta dissertação, já que as referências do artigo científico estão inseridas no capítulo I.

PARTE I

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Universidade Federal do Pampa, RS, Brasil

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM CHÁ-VERDE EM CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS ASSOCIADAS AO ENVELHECIMENTO

Autor: Maíra Frigo Flôres

Orientador: Felipe Pivetta Carpes

Co-orientadora: Pâmela Billig Mello Carpes

Data e Local da Defesa: Uruguaiana, 08 de novembro de 2013.

O envelhecimento causa prejuízos cognitivos e de memória que têm sido relacionados com o estresse oxidativo (EO). Descobrir formas de atenuar o EO é importante para minimizar perdas cognitivas. O exercício físico e as catequinas constituintes do chá verde são potenciais antioxidantes que podem auxiliar na proteção das funções cognitivas e de memória. Ao passo que evidências sugerem papel neuroprotetor do exercício, efeitos do chá verde durante o envelhecimento como estratégia para combater o EO ainda são bastante incipientes. Essa pesquisa verificou os efeitos do exercício físico e da suplementação com o chá verde sobre aspectos bioquímicos e comportamentais associados ao envelhecimento. Ratos Wistar com 9 meses de idade foram divididos em grupos, sendo eles: controle, exercício, chá verde, exercício e chá verde, além de um grupo controle jovem. As intervenções foram feitas por três meses, constando de exercício aeróbico e ingestão de chá verde de maneira isolada, e realização de exercício aeróbico com concomitante ingestão de chá verde. Em conclusão, o chá verde não evitou déficits cognitivos no envelhecimento, mas diminuiu as espécies reativas aumentando as defesas antioxidantes. O exercício melhorou diversos parâmetros bioquímicos e comportamentais. A falta de efeito do chá verde na cognição pode estar relacionada com as características da intervenção, ao passo que a diminuição nas espécies reativas sugere um papel de proteção do chá verde mesmo em um período curto de suplementação.

Palavras-Chave: corrida, memória, estresse oxidativo, catequinas, cérebro.

ABSTRACT

Master Dissertation

Graduate Program in Biochemistry

Federal University of Pampa

EFFECTS OF PHYSICAL EXERCISE AND GREEN TEA ON BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF COGNITION IN AGING

Author: Maíra Frigo Flôres

Advisor: Felipe Pivetta Carpes

Co-advisor: Pâmela Billig Mello Carpes

Place and Date of Defense: Uruguaiiana, November 08th, 2013.

Aging is associated with cognitive and mnemonic deficits frequently reported as related to the oxidative stress (OS). There is continuous interest to minimize effects of OS in order to avoid cognitive deficits. Physical exercise and catechines from green tea are potential antioxidants helping to protect cognitive and memory functions. While there are evidences supporting the neuroprotective role of physical exercise, the effects of green tea supplementation during aging as strategy to combat OS still are quiet incipient. In this study the effects of physical exercise and green tea supplementation on biochemical and behavioral characteristics associated with aging were addressed. Wistar rats 9 months aged were organized in groups as follow: young control group; aged control group; exercise aged group; green tea supplementation aged group; exercise and green tea supplementation aged group. Interventions lasted 3 months composed by aerobic exercise and green tea, combined or not. Green tea was not effective in avoid cognitive deficits associated with aging, but significantly decreases ROS activity with significant improve in antioxidants defenses. Physical exercise improved all parameter in both biochemical and behavioral testing. The lack of effects of green tea on cognition may rely on the duration of the intervention, while decrease in the ROS suggests its effect role even during a short supplementation period.

Keywords: running, memory, oxidative stress, catechines, brain.

LISTA DE FIGURAS

PARTE II

Figura 1. Desenho experimental, considerando um tempo de envelhecimento de nove meses, intervenção pelos três meses seguintes, testes comportamentais e bioquímicos dos animais.

Figura 2. Percentual do tempo total de exploração nos diferentes objetos durante o treinamento e o teste no teste de reconhecimento de objetos. Durante o treinamento, os objetos A e B foram igualmente explorados (teste t de uma amostra, média teórica de 50%) e na seqüência os dados representa as diferenças entre todos os grupos. Os números representam: 1: grupo controle jovem; 2: grupo controle idoso; 3: grupo idoso exercitado; 4: grupo idoso suplementado com chá verde; 5: grupo idoso suplementado com chá verde e exercitado. * indica diferenças entre o percentual de tempo de exploração entre o objeto e a média teórica (50%) ($P < 0.05$; teste t de uma amostra).

LISTA DE TABELAS

PARTE II

Tabela 1. Resultados dos testes comportamentais. Envelhecimento e as intervenções não tiveram efeito sobre o tempo total de exploração no teste de reconhecimento de objetos, atividades locomotoras e exploratórias, ansiedade e limiar de dor. Dados são expressos como média \pm SD do tempo total de exploração no OR, número de cruzamentos (campo aberto), número total de entradas e tempo permanecido nos braços abertos (labirinto em cruz elevado), e tempo de latência (tail flick). Não houve diferenças significativas entre os grupos (ANOVA de uma via; n = 6-10 por grupo para todos os testes). Os números representam: 1: grupo controle jovem; 2: grupo controle idoso; 3: grupo idoso exercitado; 4: grupo idoso suplementado com chá verde; 5: grupo idoso suplementado com chá verde e exercitado.

Tabela 2. Atividade antioxidante e pro-oxidante em diferentes regiões cerebrais nos diferentes grupos experimentais (média \pm SD). Os números representam: 1: grupo controle jovem; 2: grupo controle idoso; 3: grupo idoso exercitado; 4: grupo idoso suplementado com chá verde; 5: grupo idoso suplementado com chá verde e exercitado.

LISTA DE ABREVIATURAS

EROs - espécies reativas de oxigênio

GSH - glutationa

SOD - superóxido dismutase

GSSH - glutationa oxidada

EGCG - epigalocatequina 3-galato

ROS - espécies reativas de oxigênio

GPx - glutationa peroxidase

TBARS - ácido tio-barbitúrico

VO₂ - volume de oxigênio

OR - teste de reconhecimento de objetos

IA - teste de esquiva inibitória

NADPH - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

GR - glutationa redutase

DCFH-DA - 2'7' diclorofluoresceína diacetato

DEF - derivativo fluorescente oxidado

SEM - erro padrão

SD - desvio padrão

O₂. – ânion superóxido

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HO. – radical hidroxil

SUMÁRIO

Lista de Figuras	8
Lista de Tabelas	9
Perspectivas	51
Anexos	58
Resumo	6
Abstract	7
Lista de Abreviaturas	10

PARTE I

Introdução	13
1.1 Envelhecimento	13
1.2 Estresse Oxidativo	15
1.3 Exercício Físico	16
1.4 Chá Verde	18
Objetivos	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivo Específico	21

PARTE II

CAPÍTULO I

Effects of physical exercise and green tea effects on behavioral and biochemical aspects of cognition in aging	22
Abstract	23
1. Introduction	24
2. Materials and Methods	25

2.1 Animals and experimental design	25
2.2 Experimental groups and conditions	26
2.2.1 Aged control group	27
2.2.2 Exercise aged group	27
2.2.3 Green tea supplementation group	28
2.2.4 Exercise and green tea supplementation aged group	28
2.2.5 Young control group	29
2.3 Behavioral testing	29
2.3.1 Object recognition test (OR)	29
2.3.2 Inibitory avoidance test (IA)	29
2.3.3 Open field, plus maze and tail flick	30
2.4 Biochemical testing	30
2.4.1 Tissue preparation	31
2.4.2 Detection os TBARS levels	31
2.4.3 Glutatione Peroxidase (GSH-px)	31
2.4.4 Glutatione (GSH)	31
2.4.5 Free Radical Levels	31
2.5 Statistical Analysis	31
3. Results	31
3.1 Animal weight and fluid intake.....	32
3.2 Behavioural results	32
3.2.1 Object recognition	32
3.2.2 Inhibitory avoidance	34
3.2.3 Open field, plus maze and tail flick	35
3.3 Biochemical results	35
4. Discussion.....	36
5. Conclusion	38
6. References	39

PARTE III

Discussão	44
Conclusões	50

Perspectivas	51
Referências	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento

Dados da Organização Mundial de Saúde (2012) sugerem que, até o ano de 2025, a população mundial contará com quase 2 bilhões de pessoas com idade de sessenta anos ou mais. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Brasil possui, atualmente, uma população de idosos de aproximadamente 32 milhões, sendo o sexto país com maior número de idosos no mundo. Muito embora o aumento da longevidade seja um fator positivo para diversos índices de avaliação do desenvolvimento de um país, esse aumento necessita vir acompanhado do equivalente crescimento na disponibilidade dos sistemas públicos de saúde, já que existe uma tendência de maior sobrecarga destes em virtude do aumento da população.

O envelhecimento é um processo biológico contínuo, que inicia no nascimento e termina com a morte. Esse processo pode ser causado por diversos fatores, separados em duas categorias: uma genética (que o considera algo geneticamente controlado), e outra estocástica (que o considera dependente da quantidade de agressões ambientais sofridas). Um dos fatores cada vez mais estudado baseia-se na ação do estresse oxidativo, uma hipótese estocástica (Oliveira e Schöffen, 2010). Associado à senescência, período de mudanças relacionadas ao passar do tempo e com efeitos deletérios no organismo, o envelhecimento afeta a fisiologia de diversos sistemas, e assim impacta sobre a capacidade funcional do indivíduo, aumentando as chances de desenvolvimento de doenças degenerativas (Teixeira e Guariento, 2010). Especialmente em relação ao sistema nervoso e cognição, o envelhecimento compromete a

função do hipocampo (Assunção et al., 2011), e traz déficits no aprendizado e memória (Fukui et al., 2001; Serrano e Klann, 2004).

Como forma de minimizar os efeitos do envelhecimento, diversas estratégias comportamentais, nutricionais e farmacológicas são descritas na literatura. O exercício físico, realizado de maneira sistemática e em intensidades e volumes adequados, tem sido descrito como benéfico para funções cognitivas, motoras e fisiológicas em humanos (Colcombe e Kramer, 2003) e também modelos animais (Asl et al., 2008). De maneira geral, o exercício físico é tido como uma das estratégias mais eficazes para manutenção da saúde (Radák, 2005). Os estudos com modelos animais permitem investigações mais aprofundadas dos mecanismos envolvidos com o envelhecimento e como estratégias de minimização de perdas agem. Neste sentido, intervenções farmacológicas em modelos animais, ao passo que provêm efeitos positivos sobre questões associadas ao envelhecimento, possuem também certos efeitos adversos que acabam por limitar sua aplicação em humanos (Rossouw, 2010).

Dentre as estratégias nutricionais mais comuns, está a suplementação com antioxidantes. Esta estratégia tem apresentado efeitos positivos considerando a ingestão de produtos tais como vitamina C (Coskun et al., 2005), curcumina (Daffner, 2010) e resveratrol (Gomez-Pinilla, 2008). Haque et al. (2006) comentam que as catequinas são mais eficientes que as vitaminas C e E no combate ao estresse oxidativo, devido à sua potente ação como combatente de radicais livres. Contudo, as interações entre diferentes estratégias são pouco abordadas na literatura, restando questões sobre somação ou neutralização de efeitos em função das características de exercício, tipo de produto ou medicamento ingerido e reais efeitos sobre parâmetros comportamentais e bioquímicos no envelhecimento.

1.2 Estresse Oxidativo

Diversas são as evidências que associam o envelhecimento a alterações estruturais e funcionais em macromoléculas e membranas celulares, resultantes do efeito deletério de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) (Rebelatto et al., 2008). Quando a produção de EROs ultrapassa a capacidade do sistema antioxidante, ocorre o estresse oxidativo; muitos componentes celulares como os lipídeos, proteínas e DNA podem sofrer oxidação causada pelo ataque dessas EROs (Prada et al., 2007). Os mecanismos de formação das EROs estão relacionados a um aumento na produção de ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil ($HO\cdot$), dentre outros, que levam à oxidação da camada lipídica da membrana celular, trazendo alterações funcionais na célula e tecidos (Netto et al. 2007). O estresse oxidativo é um dos mecanismos associados à ocorrência de doenças degenerativas ligadas ao envelhecimento, incluindo déficits de memória (Fukui et al., 2001; Serrano e Klann, 2004). Prada et al. (2007) comentam que a peroxidação de ácidos graxos insaturados residuais de fosfolipídeos da membrana plasmática podem resultar em perda significativa da integridade da membrana, sendo este um dos mais devastadores efeitos do estresse oxidativo. Isso leva à formação de aldeídos e alcanos potencialmente nocivos que reagem com o ácido tio-barbitúrico, justificando o uso do TBARs para a mensuração de estresse oxidativo.

Coskun et al. (2005) acrescentam que existem sistemas de defesa antioxidante tanto enzimáticos (envolvendo a glutathione, catalase e peróxido dismutase) quanto não-enzimáticos (vitaminas, bilirrubina), para proteger a membrana e as organelas celulares do dano causado pelos radicais livres. A glutathione (GSH) executa um papel central na coordenação desses sistemas, estando presente em altas concentrações nas células. Quanto à função, poderíamos citar dois sistemas atuantes, sendo o primeiro sistema mais relacionado à ação antes do dano,

formado pela SOD, catalase, glutathione peroxidase e vitamina E, e o segundo relacionado à reparação do dano, envolvendo glutathione reductase, glutathione peroxidase e ácido ascórbico (Oliveira e Schöffen, 2010).

1.3 Exercício Físico

A relação entre exercício físico e melhoras na capacidade oxidativa do músculo esquelético (Prada et al., 2007) e a longevidade (Goodrick, 1980) já foi demonstrada. Adicionalmente, existem evidências de que o exercício regular também é relacionado positivamente a funções cognitivas, sendo as mais estudadas a memória e o aprendizado (Asl et al., 2008). Contudo, os mecanismos pelos quais o exercício físico afeta as funções cerebrais e o sistema nervoso em geral são complexos, envolvendo a interação de diversos fatores, como a neurogênese, especialmente no hipocampo (van Praag, 2008), a capilarização aumentada no local estimulado (Cotman et al., 2007) e redução na ocorrência de danos oxidativos e aumentos na degradação de proteínas (Radák et al., 2013). A geração de EROs durante o exercício faz parte dos efeitos adaptativos ao estresse, bem como da capacidade antioxidante ao nível sistêmico, agindo, de maneira crônica, como fator de proteção, e não de risco (Pietrelli et al., 2012). A supercompensação, ou síndrome adaptativa geral, baseada no trabalho e sua recuperação, leva a adaptações homeostáticas, metabólicas e neuropsicológicas, e com isso à proteção de diversas doenças (Pietrelli et al., 2012).

A atividade física é considerada uma das mais importantes e acessíveis formas de prevenir e proteger as funções cerebrais (Pietrelli et al., 2012). O treinamento físico de corrida na esteira rolante é um dos mais comumente utilizados em modelos animais para investigação da adaptação crônica, sendo forçado, com intensidade e duração programados (Lin et al.,

2012). Com isso, o exercício tem sido associado com melhoras na memória aversiva (Chen et al., 2008) e o aprendizado espacial (Huang et al., 2006), relacionados à amígdala (memória relacionada ao medo) e ao hipocampo, respectivamente. As diferentes intensidades dos exercícios impõem diferentes níveis de estresse ao organismo, causando adaptações diversas (Dishman et al., 2006).

O exercício aeróbico tem efeitos tanto sobre os antioxidantes enzimáticos quanto sobre os não-enzimáticos (Coskun et al., 2005). Adicionalmente, a glutatona (GSH) (principal antioxidante celular não-enzimático) e sua forma oxidada (GSSG) podem ser reduzidas durante o exercício, e as concentrações plasmáticas de antioxidantes como vitamina E e C, bem como o ácido úrico tendem a aumentar (Pietrelli et al., 2012). Ainda, a síntese de citocinas por células do sistema imune é um dos mecanismos pelo qual as imunidades são ativadas ou amplificadas, o que aumenta a imunocompetência e potencializa os efeitos benéficos do exercício (Cruzat et al., 2007).

Na relação entre envelhecimento, estresse oxidativo e exercício, a literatura demonstra que contra o envelhecimento e estresse oxidativo, o exercício físico desenvolvido de forma regular tem efeito positivo (Hillman et al., 2008). Contudo, há situações em que o exercício não pode ser a única estratégia para minimizar efeitos do envelhecimento, e há um esforço crescente na busca por estratégias comportamentais e farmacológicas que possam minimizar os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio associado ao processo de envelhecimento. Entretanto, muitas vezes as intervenções farmacológicas trazem consigo alterações na fisiologia do organismo, com efeitos colaterais indesejados e prejudiciais tanto à saúde quanto à autonomia do idoso. Isso estimula as intervenções nutricionais como fonte de cuidado ao tratar do envelhecimento.

1.4 Chá verde

A inclusão de determinados alimentos na dieta pode acarretar alterações positivas (antioxidantes exógenos) ou negativas (excesso de gorduras e açúcares) sobre a ocorrência de estresse oxidativo, o que este pode trazer consigo prejuízos ao indivíduo idoso. Sendo assim, na maioria dos casos a dieta tem o objetivo de promover um aumento no fornecimento dos antioxidantes para o organismo do indivíduo, aumentando assim seu potencial antioxidante e reduzindo o estresse oxidativo (Morillas-Ruiz et al., 2006). A deficiência dietética de antioxidantes e de outras substâncias essenciais pode causar aumentos no estresse oxidativo (Rebelatto et al., 2008), e a utilização de micronutrientes antioxidantes na dieta pode promover a prevenção de doenças relacionadas ao envelhecimento.

Uma substância que possui efeito antioxidante e pode ser inserida na dieta é o chá verde (*Camellia Sinensis*), uma bebida popular que contém grande quantidade de catequinas (30 a 40% do peso seco), um grupo de polifenóis que têm ação antioxidante (Bérubé-Parent et al., 2005). A atividade antioxidante das catequinas pode prevenir a citotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo em diferentes tecidos, pois possui ação neutralizadora de radicais livres, e ação quelante de metais de transição tais como ferro e cobre, impedindo assim a formação de espécies reativas de oxigênio pela reação de Fenton, além de ação inibidora da lipoperoxidação (Senger et al., 2010).

O chá verde traz benefícios na prevenção e tratamento de câncer, doenças cardiovasculares, inflamatórias e diabetes (Schneider e Segre, 2009), além de seu consumo ser inversamente proporcional à ocorrência de demências, como mal de Alzheimer e doença de Parkinson (Hu et al., 2007; Mendel et al., 2008), que são comumente associadas ao envelhecimento do sistema nervoso (Wang et al., 2012). Ainda, a EGCG (epigallocatequina 3-galato) (principal polifenol encontrado no chá verde) é considerada um agente preventivo e

terapêutico com capacidade de alterar o envelhecimento cerebral e a progressão de doenças neurodegenerativas, tendo impacto nos déficits cognitivos em indivíduos de idade avançada (Unno et al., 2004, 2007; Assunção et al., 2011).

Dentre os estudos que relacionam o chá verde e exercício físico, grande parte busca investigar o potencial do chá verde em reduzir os danos musculares causados pelo exercício (Haramizu et al., 2013), o que aconteceria pela sua ação anti-inflamatória e possibilidade de reduzir as espécies reativas de oxigênio (Ota et al., 2011). As microlesões musculares e o aumento na atividade mitocondrial, causado pela necessidade de gerar mais ATP durante o exercício, aumentam as EROs (Somani et al., 1995), e a ingestão de chá verde a longo prazo relaciona-se com a redução destas EROs (Haramizu et al., 2011), efeito que não ocorre com a ingestão aguda do chá verde (Jówko et al., 2012).

Murase et al. (2008) indica que a ingestão de catequinas associada ao hábito de se exercitar regularmente aumenta a endurance e previne a obesidade, tendo por explicação a oxidação de gorduras induzida pelo chá e exercício. Ainda, Jówko et al. (2011) encontraram um efeito protetor do chá verde contra os danos induzido pelo início da prática de exercícios. Entretanto, poucas evidências são presentes em relação a seus efeitos isolados ou combinados com o exercício sobre o status oxidante no cérebro e seus efeitos sobre funções de memória e aprendizado, especialmente no envelhecimento. Efeitos complementares do exercício e do chá verde, por exemplo, poderiam repercutir em ganhos maiores frente aos mecanismos oxidativo, e dessa forma promover melhores resultados do que os trazidos pelo exercício ou pela suplementação de maneira isolada.

Assim, visto que não há consenso quanto à eficácia da suplementação com antioxidantes, visto que os resultados variam de acordo com a substância ingerida, a forma de administração, a dose, o tempo de tratamento, além de diferentes efeitos da suplementação combinada, a associação do chá verde a outras intervenções antioxidantes, como o exercício

físico, pode ser uma alternativa não farmacológica e de baixo custo para minimizar os efeitos deletérios do envelhecimento sobre alterações cognitivas, como a deterioração da saúde cerebral, de pessoas idosas (Pietrelli et al., 2012). Com base nestes pressupostos que propomos a presente investigação, que buscou analisar os efeitos do exercício físico e da suplementação com chá verde, combinados ou não, sobre características bioquímicas e comportamentais associadas ao envelhecimento.

Considerando que a investigação destes mecanismos cerebrais requer a análise das estruturas cerebrais que contribuem para os processos cognitivos de memória e aprendizado, utilizamos um modelo animal de roedores (ratos Wistar machos). Durante o desenvolvimento deste estudo, todos os experimentos foram conduzidos em concordância com os “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication nº 80-23, revisada em 1996), tendo todos sido aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Pampa, com protocolo de aprovação número 042-2012 (ANEXO I).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos do exercício físico e da suplementação com chá verde sobre características bioquímicas e comportamentais associadas ao envelhecimento.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o estresse oxidativo de tecidos neurais em modelo animal de envelhecimento submetido a exercício físico e à suplementação de chá verde, isolados ou combinados;
- Avaliar alterações comportamentais em modelos animais de envelhecimento submetidos a exercício físico combinado à suplementação de chá verde;
- Comparar as respostas bioquímicas e comportamentais obtidas pelo exercício e suplementação com chá verde em modelos animais de envelhecimento.

PARTE II

CAPÍTULO I

Artigo submetido

Rejuvenation Research

EFFECTS OF GREEN TEA AND PHYSICAL EXERCISE ON BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF COGNITION IN AGING

Maíra F Flôres¹, Alexandre Martins², Helen L Schmidt¹, Francielli W Santos³, Pâmela
B Mello-Carpes², Felipe P Carpes^{1*}

¹ Applied Neuromechanics Group, Laboratory of Neuromechanics, Federal University of
Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

² Physiology Research Group, Stress, Memory and Behavior Lab, Federal University of
Pampa, Uruguaiana, RS, Brazil

³ Laboratório de Biotecnologia da Reprodução, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana,
RS, Brazil

Word count: 3340

Keywords: treadmill running; memory; oxidative stress; antioxidants; brain.

Abbreviated title: Green tea and exercise in aging

***corresponding author**

BR 472 km 592 - Po box 118 - ZIP 97500-970, Uruguaiana, RS, Brazil

Phone: +55 55 3413 4321

Fax: +55 55 3414 1484

e-mail: carpes@unipampa.edu.br

EFFECTS OF GREEN TEA AND PHYSICAL EXERCISE ON BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF COGNITION IN AGING

ABSTRACT

Here we investigated the effects of physical exercise and green tea supplementation (combined or not) on biochemical and behavioral parameters associated with normal aging. Male wistar rats 9 month aged were divided into groups control, submitted to physical exercise and supplemented with green tea while performing or not physical exercise. A young control group was also considered. Physical exercise (treadmill running) and green tea supplementation lasted three months. Afterwards, behavioral and biochemical tests were performed. Biochemical testing revealed different antioxidant and oxidant responses for hippocampus, prefrontal cortex and striatum. Age-related cognitive deficits were reversed by physical exercise. Green tea do not reverse cognitive deficits associated with aging but significantly decreases reactive oxygen species activity and improve antioxidants defenses. Associating green tea supplementation and physical exercise do not provide additional improvements in behavioral or biochemical markers in aged rats.

Introduction

Oxidative stress is associated with a range of degenerative diseases in the aging, including learning and memory deficits^{1,2}. Age-related deficits may have association with structural and functional changes in macromolecule and cell membranes at least in part resultant of activity of free radicals and reactive oxygen species (ROS)³. Regular physical exercise is an efficient strategy to protect the brain functions during aging⁴.

ROS generated during aerobic exercise are part of the adaptation mechanism to the aerobic training, and among the long term effects is a general improvement in both enzymatic/non-enzymatic antioxidants⁵. However, physical activity levels among the population are still below the expected for health, which foment interest in behavioral or pharmacological interventions to minimize ROS during aging, especially among those subjects not able to exercise regularly. In this regard, nutritional interventions are frequent among aged subjects aiming at improve ingestions of antioxidant substances⁶.

The green tea (*Camellia Sinensis*) has large amount of catechines (30-40% of dry weight), a polyphenol with potential antioxidant activity⁷. The ingestion of green tea, frequently observed among aged subjects⁸, was inversely related with chances of developing Alzheimer and Parkinson disease^{9,10}. The epigallocatechin gallate (EGCG) is a major constituent of the green tea, which have been investigated concerning its preventive and therapeutic potential role for cerebral aging as well as progression of neurodegenerative diseases in the aging¹¹⁻¹³.

Physical exercise has been associated with ingestion of green tea with a major concern in reducing exercise-induced muscle damage¹⁴. Such role was described as dependent on the antioxidant potential of the green tea¹⁵ after long term¹⁶ but no after single doses¹⁷.

However, the biochemical and behavioral effects of green tea supplementation associated with physical exercise on cognition have been briefly addressed. The positive association of long term green tea intake and physical performance during exercise could have important implications for aged subjects if reflecting positive effects also for cognitive function. Here we propose experiments to verify specific roles of exercise and green tea, combined or not, for biochemical and behavioral adaptations to the aging considering different brain regions and different behavioral tasks.

Material and methods

Animals and experimental design

Male Wistar rats were bought at a registered vivarium. They were housed three per cage and maintained under controlled light and environmental conditions (12h light/12 h dark cycle; temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$; humidity $50\pm 10\%$) with food and water *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with the “*Principles of laboratory animal care*” (NIH publication n° 80-23, revised 1996) and with the guidelines established by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Local Institution (IRB #0422012), to ensure that number of animal and suffering were kept to a minimum. During the experiment weight and liquid consumption were measured for every animal once a week. When animals were 9 months age, they were divided into 4 groups: aged group (n=16), exercise aged group (n=18), green tea supplementation aged group (n=18) and exercise and green tea supplementation aged group (n=21). Moreover, at the time of behavioral and biochemical testing, 2 months old rats were assigned to the young control group not submitted to any intervention (n=10). Animals from all groups were decapitated for posterior tissue preparation and biochemical analyses to quantify concentration of glutathione (GSH), reactive oxygen species levels (ROS), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and glutathione peroxidase activity

(GPx). NADPH, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and GSH reagents were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Other reagents used in this study were of analytical grades and obtained from standard commercial supplier. Experiments followed the experimental designed illustrated in Figure 1. During the behavioral tests, necessary to perform before biochemical analyses, intervention was sustained.

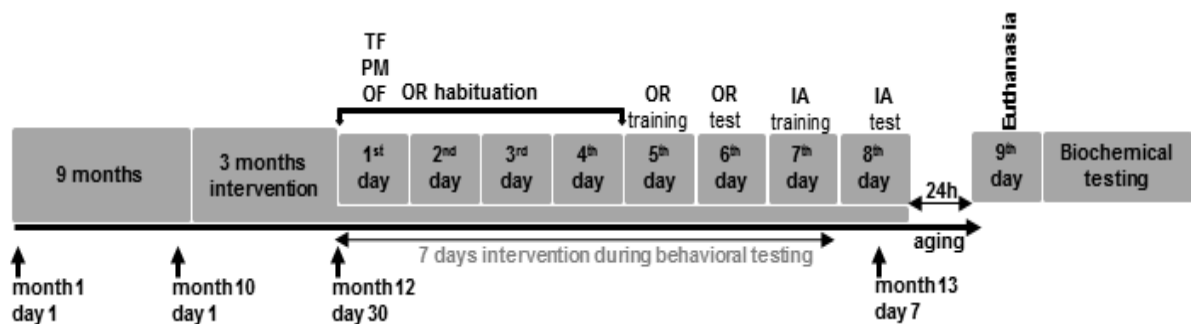


Fig. 1. Experimental design considering a 9 months aging, interventions lasting 3 continued until the 7th day of behavioral testing, behavioral testing and behavioral control experiments, and the biochemical testing of the animals.

Experimental groups and conditions

Aged group

Animals from aged group had access to food and water *ad libitum*. They were free to movement and daily manipulated in the same frequency of animals from other groups.

Exercise aged group

Animals in this group had access to food and water *ad libitum*. They were submitted to the physical exercise intervention. Physical exercise was individual treadmill running performed at intensity of 60-70% maximal oxygen uptake (VO₂) (belt velocity between 9 m/min and 13 m/min), in sessions lasting 30 min, 5 times a week, always in the same period of day, in light time⁵. In the week previously to start of intervention, animals performed a daily treadmill

running for ten minutes, to habituate before performing the first VO₂ test. To determine the individual intensity of exercise, we conducted an indirect VO₂ test, consisting in a treadmill running, starting with low velocity enhanced 5 m/min every 3 min, until rat was unable to keep running. Time to fatigue (min) and work volume (m/min) were considered as an indirect measure of maximum oxygen consumption^{18, 19}. In the middle of exercise intervention (week 6), an additional indirect VO₂ test was conducted to adjust exercise intensity. At the end of exercise treatment (week 12), a last indirect VO₂ test was performed to ensure improvement in aerobic condition after the intervention.

Green tea supplementation aged group

Animals in this group received food and instead of water, they received green tea mixed with drinking water (13.33 g/L), as described elsewhere²⁰. Food and green tea were *ad libitum* and animals were free to movement and daily manipulated. Green tea was prepared daily in the morning and administrated at ambient temperature. The daily volume intake was monitored. Green tea samples, Madrugada Co., used in this study were purchased from standard markets and analyzed by spectrophotometry using the Folin-Ciocalteu method modified²¹, which ensured the total polyphenols content (concentration 819,5 µEq GAE/mL), and by high-performance liquid chromatography, which ensured presences of epicatechin (concentration of 83.35 µg/mL), epigallocatechin gallate (299.56 µg/mL) and epicatechin gallate (86.05 µg/mL).

Exercise and green tea supplementation aged group

Animals from this group exercised at the same way as described for the exercise aged group, and received green tea as described for the green tea supplementation aged group.

Young control group

Animals from this group were 2 months old and served as a control to verify effects of aging. They were housed as the other groups with food and water *ad libitum*. They were free to move and daily manipulated in the same frequency of animals from other groups.

Behavioral testing

Object recognition test (OR)

Training and testing in the object recognition (OR) task were carried out in an open-field arena (50 x 50 x 50 cm) built with polyvinyl chloride plastic, plywood and transparent acrylic²². Animals were first habituated when each animal was placed in the apparatus for 20 min to freely explore during 4 consecutive days before the training. For training, two different objects (A and B) were placed in the apparatus and animals were allowed to explore them freely for 5 min. The objects were made of metal, glass, or glazed ceramic. Exploration was defined as sniffing or touching the objects with the nose and/or forepaws. Sitting on or turning around the objects was not considered an exploratory behavior. A video camera was positioned over the arena, and the rats' behavior was recorded using a video tracking and analysis system for later evaluation. On 24h, on test phase, one of the objects was randomly exchanged for a novel object (C) and rats were reintroduced into the apparatus during 5 min. To avoid confounds by lingering olfactory stimuli and preferences, the object and the arena were cleaned after testing each animal with 70% ethanol.

Inhibitory avoidance test (IA)

Rats were trained in a one-trial step-down inhibitory avoidance task. The training apparatus was a 50 x 25 x 25 cm plexiglass box with a 5 cm-high, 8 cm-wide, and 25 cm-long platform on the left end of a series of bronze bars which made up the floor of the box. For training,

animals were placed on the platform facing the left rear corner of the training box. When they stepped down and placed their four paws on the grid, received a 2 s, 0.5 mA scrambled footshock. Memory retention was evaluated in a no reinforced test session carried out 24 h after training.

Open field, plus maze and tail flick

To analyze exploratory and locomotor animal activities and ensure that any procedure impaired such behaviors, after three months of intervention rats were placed on the left quadrant of a 50 x 50 x 39 cm open field made with wooden painted white, with a frontal glass wall. Black lines were drawn on the floor to divide it into 12 equal quadrants. Crossing and rearing, as measures for locomotor activity and exploration, respectively, were measured over 5 min²³. To evaluate the animals' anxiety state rats were exposed to an elevated plus maze²⁴. The time spent into the open arms was recorded over a 5 min session. To ensure the inhibitory avoidance testing efficacy, nociception was measure using tail flick test²⁵. For the test, pain was induced by giving infrared light on the tail of the mice 5 cm away from the tip of the tail. Reaction time (tail-flick latency) was noted by observing the interval between placing the tail on the infrared light source and the withdrawal of the tail.

Biochemical testing

Response of some antioxidants (GSH and GPx) to the exercise differs between brain regions²⁶. Therefore, we analyzed different regions of the brain (striatum, prefrontal cortex and hippocampus) related to motor behavioral and memory.

Tissue preparation

Animals were decapitated 24 h after behavioral experiments. Brain was removed and hippocampus, prefrontal cortex and striatum were quickly dissected out and homogenized in 10 volumes of Tris HCl (50 mM, pH 7.4). Afterwards, samples were centrifuged at 2400x g for 20 min, and supernatants (S1) were used for assay.

Detection of TBARS level

Lipoperoxidation was evaluated by the thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) test²⁷. One aliquot of S1 was incubated at 95°C for 2h, and the color reaction was measured at 532 nm. Results were expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) per mg protein.

Glutathione Peroxidase

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured spectrophotometrically²⁸ in a system containing GSH/NADPH/GR by dismutation of H₂O₂ at 340 nm. The enzymatic activity was expressed by the consumption of NADPH in nmol/min/mg of protein.

Glutathione (GSH)

GSH levels were determined fluorometrically²⁹. The samples were homogenized in perchloric acid (HClO₄) and centrifuged at 3000 x g for 10 min. S1 was incubated with ortho-phthalaldehyde, and fluorescence was measured at excitation of 350 nm and emission of 420 nm. Results were expressed as nmol g⁻¹ of tissue.

Free Radical Levels

Free radicals content was assessed using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) as a probe. The sample was incubated in darkness with 5 µL DCFH-DA (1mM). The

formation of the oxidized fluorescent derivative (DCF), measured by DCF fluorescence intensity, was recorded at 520 nm (480 nm excitation) by a spectrofluorometric method, 30 min after the addition of DCFH-DA to the medium. Results were expressed as AU (arbitrary units).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using a commercial statistical package (Prisma v. 5.0, GraphPad Software Inc., US). Data were checked for normalcy and compared between groups or condition. A significance of 0.05 was defined *a priori* for all analyses. Tests performed are described in the results section to improve readability.

Results

Animal weight and fluid intake

Weight of the animals at the start and end of interventions was not statistically different between neither within the aged groups ($P < 0.05$; Mann-Whitney test). The water or green tea intake was similar between the groups.

Behavioral results

Object recognition

In the OR training session all animals explored for a similar percent of total exploration time two new objects (A and B; Figure 2, training). In the testing session, 24h after training, animals from the aged control group and the green tea supplementation aged group (groups 2 and 4, respectively) spent similar percent of total exploration time exploring the novel and the familiar object (Figure 2). Rats from young control group explored the novel object (named

C) significantly longer than the familiar one ($71.11 \pm 5.78\%$ of total exploration time was exploring the new object; Figure 2, group 1).

Aged groups submitted to physical exercise with or without green tea supplementation (groups 3 and 5, respectively) explored the novel object significantly longer than the familiar one ($69.32 \pm 7.32\%$ of total exploration time was exploring the new object in the group 3; $68.81 \pm 6.21\%$ of total exploration time was exploring the new object in the group 5; Figure 2).

The total exploration time in the test session was similar between all groups (table 1, exploration time in OR test).

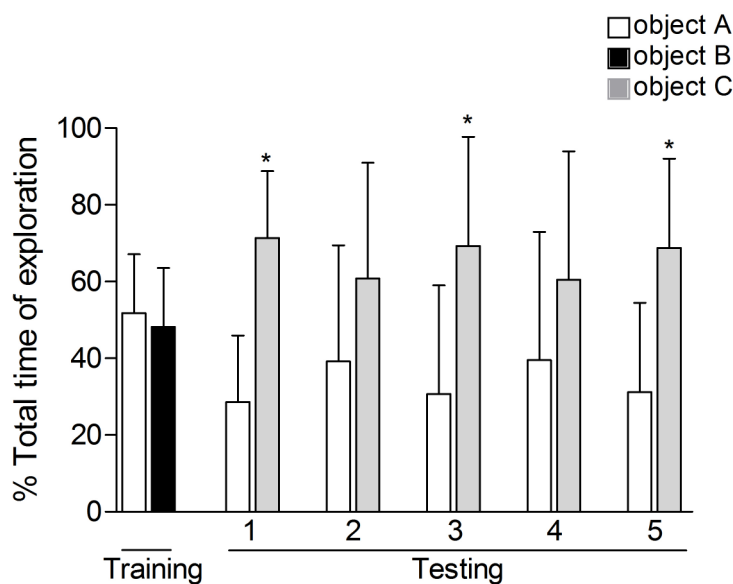


Fig. 2. Percent of total exploration time for different objects during training and test in the object recognition task. In the training, the objects A and B were equally explored by all groups (one-sample t-test, theoretical mean of 50%) and therefore data are presented averaged for all groups. In the testing numbers represent: 1: young control group; 2: aged control group; 3: exercise aged group; 4: green tea supplementation aged group; 5: exercise and green tea supplementation aged group. * indicates difference between the percent of exploration time for object and theoretical mean (50%) ($P < 0.05$; one sample t-test).

Inhibitory avoidance

In the evaluation of inhibitory avoidance, animals from all groups presented similar step down latency in the training session ($P=0.85$; Kruskal-Wallis test). Therefore, the mean for all animals in the training is presented (Figure 3, training). Although all groups presented differences in step down latency between training and testing ($P<0.05$; Mann-Whitney test), the differences were lower in the aged control group, green tea supplementation aged group and exercise and green tea supplementation aged group ($P<0.05$; Mann-Whitney test; Figure 3, testing, groups 2, 4 and 5) than in young control group ($P<0.05$; Mann-Whitney test; Figure 3, testing, group 1) and exercise aged group ($P<0.05$; in the Mann-Whitney test; Figure 3, testing, group 3). Aged animals presented significant lower step down latencies than young ($P=0.042$; Mann-Whitney test). Among the aged groups, only the exercise aged group enhanced latency ($P=0.044$; Mann-Whitney test) reaching values similar those found in the young control group ($P=0.94$; Mann-Whitney test).

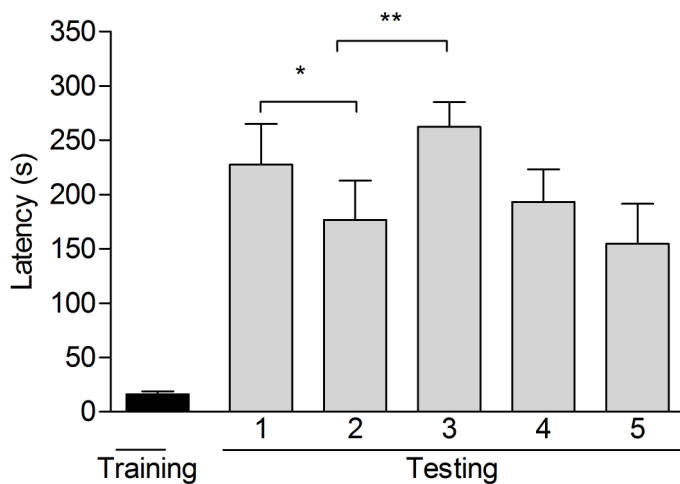


Fig. 3. Step down latency in the inhibitory avoidance task training (mean of all groups) and testing. All the groups increased their latency when compared training and test session (* $P < 0.05$; Wilcoxon test). Numbers represent: 1: young control group 2: aged control group; 3: exercise aged group; 4: green tea supplementation aged group; 5: exercise and green tea supplementation aged group. The aged group (2) presented impaired retention of inhibitory

avoidance long-term memory when compared to young control group (1). Exercise per se (exercise aged group, 3) prevents aversive memory impairment associated with aging. Although, the green tea, isolated or in combination with exercise (green tea supplementation aged group, 4, and exercise and green tea supplementation aged group, 5), did not prevent ($P=0.97$ and 0.24 , respectively; Mann-Whitney test). Data represent the mean \pm SEM of escape latency to step down in inhibitory avoidance on training and test. $n = 6-10$ per group.

Open field, elevated plus maze and tail flick

Aging and interventions did not affect the number of crossings and rearing during the 5 min free exploration session at the open field (Table 1 – Open Field). Similarly, no effects in the total number of entries or in time spent at open arms during the plus maze session were found (Table 1 – Plus maze) and in latency time to reaction in the tail flick (Table 1 – Tail Flick).

Table 1. Result of behavioral tasks. Aged and interventions had no effect on total time of exploration in object recognition task (OR), locomotor and exploratory activities, anxiety and pain thresholds. Data are expressed as mean \pm SD of the total time of exploration for OR, number of crossings (open field), total number of entries and the time spent in the open arms (plus maze), and time latency (tail flick). There were no differences between the groups (one-way ANOVA; $n = 6-10$ per group for all tests). Group numbers represent: 1: young control group; 2: aged control group; 3: exercise aged group; 4: green tea supplementation aged group; 5: exercise and green tea supplementation aged group.

Behavioral tasks		Groups				
		1	2	3	4	5
Exploration time in OR	Total exploration	29.89 \pm	19.62 \pm	9.90 \pm 8.78	16.25 \pm	20.43 \pm
	time in test (s)	21.22	15.85		11.66	14.07
Open field	Crossings (n°)	31.89 \pm	22.38 \pm	22.17 \pm	14.56 \pm	23.43 \pm
		15.90	17.86	14.94	11.36	14.71
Plus maze	Time in open arms (s)	13.73 \pm	13.37 \pm	13.43 \pm	9.40 \pm	6.57 \pm
		14.40	13.66	14.70	12.61	15.98
Tail flick	Times (s)	5.79 \pm 1.64	5.40 \pm 1.47	5.83 \pm 1.18	5.38 \pm 1.16	5.50 \pm 1.09

* $P < 0.05$ compared to the young control group (Anova one-way, Tukey).

Biochemical results

Biochemical data elicits antioxidant defense varied between brain regions (Table 2). Rats from aged group presented lower antioxidant defenses (expressed by GSH levels and GPx activity) compared with young control group (P=0.002, P=0.008 and P=0.002, in hippocampus, striatum and prefrontal cortex, respectively, for GSH; and P=0.01 in hippocampus for GPx).

When comparing aged group with the intervention groups, increased GSH levels was found in prefrontal cortex (P=0.0043), and increased GPx in hippocampus (P=0.0043) and in striatum (P=0.041) in the exercise aged group. Similar results were observed in prefrontal cortex GSH (P<0.0022) and striatum GPx (P=0.041) in the exercise and green tea supplementation aged group, and striatum GPx (P=0.041) and cortex GSH (P=0.015) in the green tea supplementation aged group.

Considering oxidant markers, all interventions (green tea, exercise and both associated) decreased ROS levels in the hippocampus and striatum (P≤0.01), but any change was observed in prefrontal cortex. The lipid peroxidation (TBARS) was not altered in the intervention groups, which presented values similar to the control groups, except for prefrontal cortex (P<0.01) in exercise aged rats.

Brain region	Group	Antioxidant		Pro-oxidant	
		GSH (nmol g ⁻¹)	GPx (nmol/min/mg)	ROS (AU)	TBARS (nmol/mg)
Hippocampus	1	524.50* ± 52.70	9.25* ± 2.49	272.70 ± 23.51	107.20 ± 8.54
	2	285.90 ± 66.14	4.96 ± 1.93	250.30 ± 19.11	114.90 ± 12.60
	3	372.80 ± 68.95	10.17* ± 3.16	187.90* ± 27.11	130.60 ± 12.06
	4	269.20 ± 47.84	9.03 ± 3.34	167.80* ± 25.02	103.10 ± 23.64
	5	343.30 ± 27.61	7.34 ± 4.10	169.60* ± 47.29	120.60 ± 17.09
Striatum	1	218.00* ± 18.96	6.32 ± 1.67	160.50 ± 32.12	43.99 ± 11.32
	2	179.30 ± 18.86	3.79 ± 2.13	172.70 ± 38.44	46.32 ± 11.22
	3	201.90 ± 24.11	6.67* ± 1.68	75.17* ± 32.15	42.56 ± 6.31
	4	198.00 ± 20.06	7.32* ± 2.25	109.10* ± 35.38	35.72 ± 5.99
	5	195.00 ± 20.05	8.64* ± 5.53	104.10* ± 32.33	38.86 ± 8.64
Prefrontal Cortex	1	244.50* ± 45.02	3.04 ± 1.60	137.30 ± 23.16	139.60 ± 8.91
	2	154.20 ± 16.77	2.68 ± 0.75	130.00 ± 22.79	131.90 ± 11.51
	3	250.10* ± 46.60	2.11 ± 1.14	125.70 ± 16.66	155.60* ± 7.45
	4	223.10* ± 44.13	3.88 ± 1.08	123.90 ± 16.06	112.60 ± 21.25
	5	227.20* ± 29.32	3.93 ± 1.81	124.20 ± 14.32	116.70 ± 11.21

* Significant difference in relation to aged group ($P < 0.05$; Mann-Whitney test; $P < 0.05$); GSH expression was higher in young control group (1) ($P < 0.01$) than aged control group (2), and all interventions enhanced its expression in the prefrontal cortex ($P < 0.01$). Gpx values were elevated in young control group (1; $P < 0.015$) just in the hippocampus, and in all interventions groups (3, 4 and 5; $P < 0.05$) in striatum, when compared with aged control group (2). Hippocampal ($P < 0.01$) and striatal ROS ($P < 0.01$) decreased in response to all interventions groups (3, 4 and 5) when compared with aged control group. TBARS values are higher in the prefrontal cortex of exercise aged group (3; $P < 0.01$) when compared with aged control group (2).

Discussion

Considering the importance of antioxidants during aging, here we present experiments to verify the influence of interventions based in physical exercise and green tea, associated or not, on biochemical and behavioral adaptations to the normal aging. After biochemical and behavioral testing we observed aged rats developed cognitive deficits. Although such deficits were not reduced by green tea supplementation, lower levels of reactive oxygen species and improvement in antioxidant defenses were observed in rats after long term green tea intake. Aged rats submitted to physical exercise presented no cognitive deficits. Indeed, these animals presented higher antioxidant status as well as reduced ROS levels. While combining physical exercise and green tea did not improve biochemical and behavioral parameters monitored, we can assume that physical exercise and green tea elicited improvements in different aspects of aging.

The cognitive deficits resulting from aging were evident in the object recognition task (long term memory) and the inhibitory avoidance (aversive long term memory). Cognitive deficits were improved in the aged rats submitted to physical exercise, but not among those green tea supplemented. Cognitive performance after physical training is related to the hippocampus

activity³⁰⁻³², and these improvements are most likely resulting from neuroplasticity in different brain regions related to learning and memory³³.

The physical exercise used here was based in previous studies eliciting improvement in learning and memory. As the exercise parameters to improve cognition are widely known, effects of green tea supplementation seems to be influenced by factors such as animal age³⁴,³⁵, the duration of intervention^{34,36} and dose concentration³⁴. Additionally, it seems that the onset of cognitive effects may differ between animal species^{12,13,34,35}. Therefore, the effects of green tea on cognitive status depend on several factors, with the general conclusion that long time supplementation may provide better results.

We found aged rats presenting lower antioxidant defenses when compared with young, which help to explain the worst performance in cognitive tasks for those aged animals. Our results suggest that the onset of the green tea effects on oxidative status and antioxidants defenses happen early than those expected for cognition. While behavioral tasks were not improved in green tea supplemented groups, we found both exercise aged group and exercise and green tea supplementation aged group presenting higher GSH levels and GPx activity, both related with antioxidant defenses, in the prefrontal cortex and striatum, respectively. It might suggest that neural plasticity could start early due to the green tea supplementation, with effects on biochemical makers happening before behavioral changes. The participation of green tea for these results still debatable, as previous investigations reported similar effects in the striatum after physical training²⁶. In the hippocampus, only exercise promoted changes in the antioxidant defenses, which agree with the concept that antioxidant enzymes activity may vary within brain regions and the effects of exercise may also depend on the brain region³⁷.

Antioxidant defenses were not largely altered with the green tea supplementation. At first look, we expected more significant changes. Such affirmation is based in previous investigations observing favorable changes in glutathione levels and antioxidant enzymes activity after long term green tea intake ^{11, 38, 39}. However, it is important to consider that effects of green tea are not as clear of those obtained with physical exercise.

The reduction in ROS most likely results of the activity of green tea catechines as radical scavenger of ROS ¹¹. Haque et al. ³⁴ reported reduced hippocampal lipoperoxides and ROS levels after long-term green tea administration in rats. We highlight this result since the cognitive impairment observed with aging has been suggested as a result of increase in the levels of ROS. Although significant in our experiments, the magnitude of these effects may also rely on the doses administrated. Haque et al. ³⁵ observed benefits of 5g/L intake during 26 weeks with ROS activity measured in the hippocampus but not in prefrontal cortex. Here we found effects for hippocampus and striatum, but not for prefrontal cortex after 3 months supplemented with green tea. Similar effects were observed for exercise. In the prefrontal cortex green tea had any effect. However, we observed increase for TBARS, suggesting increase in lipid peroxidation ⁴⁰. ROS were lower in both physical exercise groups compared to control, which denote the protective effect of exercise against oxidative stress and inflammation in the brain ⁴¹.

Conclusion

Green tea was not effective in avoid cognitive deficits associated with aging, but significantly decreases ROS activity and improve antioxidants defenses. Physical exercise improved all biochemical and behavioral parameters tested. Associating green tea supplementation and

physical exercise do not provide additional improvements in behavioral or biochemical markers in aged rats.

Acknowledgments

This research was funded by CAPES – Brazil (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Author Disclosure Statement.

Authors declare no competing financial interests exist concerning the content of this document.

References

1. Fukui K, Onodera K, Shinkai T, Suzuki S, Urano S. Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. Ann N Y Acad Sci. Apr 2001;928:168-175.
2. Serrano F, Klann E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. Ageing Res Rev. Nov 2004;3(4):431-443.
3. Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. J Signal Transduct. 2012;2012:646354.
4. Asl NA, Sheikhzade F, Torchi M, Roshangar L, Khamnei S. Long-term regular exercise promotes memory and learning in young but not in older rats. Pathophysiology. Jun 2008;15(1):9-12.
5. Andrews RJ. Treadmill for small laboratory animals. J Appl Physiol. May 1965;20(3):572-574.
6. Morillas-Ruiz JM, Villegas Garcia JA, Lopez FJ, Vidal-Guevara ML, Zafrilla P. Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress. Clin Nutr. Jun 2006;25(3):444-453.
7. Berube-Parent S, Pelletier C, Dore J, Tremblay A. Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. Br J Nutr. Sep 2005;94(3):432-436.
8. Wang JL, Wang PC. The effect of aging on the DNA damage and repair capacity in 2BS cells undergoing oxidative stress. Mol Biol Rep. Jan 2012;39(1):233-241.
9. Hu G, Bidel S, Jousilahti P, Antikainen R, Tuomilehto J. Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease. Mov Disord. Nov 15 2007;22(15):2242-2248.
10. Mandel SA, Amit T, Kalfon L, Reznichenko L, Weinreb O, Youdim MB. Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea

- polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG). J Alzheimers Dis. Oct 2008;15(2):211-222.
11. Assuncao M, Santos-Marques MJ, Carvalho F, Lukoyanov NV, Andrade JP. Chronic green tea consumption prevents age-related changes in rat hippocampal formation. Neurobiol Aging. Apr 2011;32(4):707-717.
 12. Unno K, Takabayashi F, Kishido T, Oku N. Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). Exp Gerontol. Jul 2004;39(7):1027-1034.
 13. Unno K, Takabayashi F, Yoshida H, Choba D, Fukutomi R, Kikunaga N, Kishido T, Oku N, Hoshino M. Daily consumption of green tea catechin delays memory regression in aged mice. Biogerontology. Apr 2007;8(2):89-95.
 14. Haramizu S, Ota N, Hase T, Murase T. Catechins suppress muscle inflammation and hasten performance recovery after exercise. Med Sci Sports Exerc. Sep 2013;45(9):1694-1702.
 15. Ota N, Soga S, Haramizu S, Yokoi Y, Hase T, Murase T. Tea catechins prevent contractile dysfunction in unloaded murine soleus muscle: a pilot study. Nutrition. Sep 2011;27(9):955-959.
 16. Haramizu S, Ota N, Hase T, Murase T. Catechins attenuate eccentric exercise-induced inflammation and loss of force production in muscle in senescence-accelerated mice. J Appl Physiol. Dec 2011;111(6):1654-1663.
 17. Jowko E, Sacharuk J, Balasinska B, Wilczak J, Charmas M, Ostaszewski P, Charmas R. Effect of a single dose of green tea polyphenols on the blood markers of exercise-induced oxidative stress in soccer players. Int J Sport Nutr Exerc Metab. Dec 2012;22(6):486-496.
 18. Cechetti F, Worm PV, Elsner VR, Bertoldi K, Sanches E, Ben J, Siqueira IR, Netto CA. Forced treadmill exercise prevents oxidative stress and memory deficits following chronic cerebral hypoperfusion in the rat. Neurobiol Learn Mem. Jan 2012;97(1):90-96.
 19. Costa MS, Ardais AP, Fioreze GT, Mioranza S, Botton PH, Souza DO, Rocha JB, Porciuncula LO. The impact of the frequency of moderate exercise on memory and brain-derived neurotrophic factor signaling in young adult and middle-aged rats. Neuroscience. Oct 11 2012;222:100-109.
 20. Mustata GT, Rosca M, Biemel KM, Reihl O, Smith MA, Viswanathan A, Strauch C, Du Y, Tang J, Kern TS, Lederer MO, Brownlee M, Weiss MF, Monnier VM. Paradoxical effects of green tea (*Camellia sinensis*) and antioxidant vitamins in diabetic rats: improved retinopathy and renal mitochondrial defects but deterioration of collagen matrix glycooxidation and cross-linking. Diabetes. Feb 2005;54(2):517-526.
 21. Chandra S, De Mejia Gonzalez E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. J Agric Food Chem. Jun 2 2004;52(11):3583-3589.
 22. Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behav Brain Res. Nov 1 1988;31(1):47-59.
 23. Bonini JS, Bevilacqua LR, Zinn CG, Kerr DS, Medina JH, Izquierdo I, Cammarota M. Angiotensin II disrupts inhibitory avoidance memory retrieval. Horm Behav. Aug 2006;50(2):308-313.
 24. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J Neurosci Methods. Aug 1985;14(3):149-167.

25. Tjolsen A, Lund A, Berge OG, Hole K. An improved method for tail-flick testing with adjustment for tail-skin temperature. J Neurosci Methods. Jan 1989;26(3):259-265.
26. Somani SM, Ravi R, Rybak LP. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. Pharmacol Biochem Behav. Apr 1995;50(4):635-639.
27. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. Jun 1979;95(2):351-358.
28. Wendel A. Glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1981;77:325-333.
29. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Anal Biochem. Jul 1976;74(1):214-226.
30. Berchtold NC, Castello N, Cotman CW. Exercise and time-dependent benefits to learning and memory. Neuroscience. May 19 2010;167(3):588-597.
31. O'Callaghan RM, Ohle R, Kelly AM. The effects of forced exercise on hippocampal plasticity in the rat: A comparison of LTP, spatial- and non-spatial learning. Behav Brain Res. Jan 25 2007;176(2):362-366.
32. Radak Z, Toldy A, Szabo Z, Siamilis S, Nyakas C, Silye G, Jakus J, Goto S. The effects of training and detraining on memory, neurotrophins and oxidative stress markers in rat brain. Neurochem Int. Sep 2006;49(4):387-392.
33. Lin TW, Chen SJ, Huang TY, Chang CY, Chuang JI, Wu FS, Kuo YM, Jen CJ. Different types of exercise induce differential effects on neuronal adaptations and memory performance. Neurobiol Learn Mem. Jan 2012;97(1):140-147.
34. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Hara Y, Shido O. Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by Abeta1-40 in rats. J Nutr Biochem. Sep 2008;19(9):619-626.
35. Haque AM, Hashimoto M, Katakura M, Tanabe Y, Hara Y, Shido O. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. J Nutr. Apr 2006;136(4):1043-1047.
36. Rodrigues J, Assuncao M, Lukoyanov N, Cardoso A, Carvalho F, Andrade JP. Protective effects of a catechin-rich extract on the hippocampal formation and spatial memory in aging rats. Behav Brain Res. Jun 1 2013;246:94-102.
37. Radak Z, Marton O, Nagy E, Koltai E, Goto S. The complex role of physical exercise and reactive oxygen species on brain. J Sport and Health Sci. 2013;2(2):87-93.
38. Li Q, Zhao H, Zhao M, Zhang Z, Li Y. Chronic green tea catechins administration prevents oxidative stress-related brain aging in C57BL/6J mice. Brain Res. Sep 24 2010;1353:28-35.
39. Xu Y, Zhang JJ, Xiong L, Zhang L, Sun D, Liu H. Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. J Nutr Biochem. Aug 2010;21(8):741-748.
40. Coskun S, Gonul B, Guzel NA, Balabanli B. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. Mol Cell Biochem. Dec 2005;280(1-2):135-138.
41. Gerecke KM, Kolobova A, Allen S, Fawer JL. Exercise protects against chronic restraint stress-induced oxidative stress in the cortex and hippocampus. Brain Res. May 6 2013;1509:66-78.

FIGURES AND TABLES CAPTIONS IN ORDER OF APPEARANCE

Figure 1. Experimental design considering the 9 months normal aging period, interventions during 3 months and continued until the 7th day of behavioral testing, behavioral testing, and the biochemical testing of the animals. TF: tail flick; PM: plus maze; OF: open field; OR: object recognition; IA: inhibitory avoidance.

Figure 2. Percent of total exploration time spent for different objects during training and test in the object recognition task. In the training, the objects A and B were equally explored by all groups (one-sample t-test, theoretical mean of 50%) and therefore data are presented averaged for all groups. In the testing numbers represent: 1: young control group; 2: aged control group; 3: exercise aged group; 4: green tea supplementation aged group; 5: exercise and green tea supplementation aged group. * indicates difference between the percent of exploration time for object and theoretical mean (50%) ($P < 0.05$; one sample t-test).

Figure 3. Step down latency in the inhibitory avoidance task training (mean of all groups) and testing. All the groups increased their latency when compared training and test session (* $P < 0.05$; Wilcoxon test). Numbers represent: 1: young control group 2: aged control group; 3: exercise aged group; 4: green tea supplementation aged group; 5: exercise and green tea supplementation aged group. The aged group (2) presented impaired retention of inhibitory avoidance long-term memory when compared to young control group (1). Exercise per se (exercise aged group, 3) prevents aversive memory impairment associated with aging.

Although, the green tea, isolated or in combination with exercise (green tea supplementation aged group, 4, and exercise and green tea supplementation aged group, 5), did not prevent ($P =$

0.97 and 0.24, respectively; Mann-Whitney test). Data represent the mean \pm SEM of escape latency to step down in inhibitory avoidance on training and test. n = 6-10 per group.

Table 1. Results of behavioral tasks. Aged and interventions had no effect on total time of exploration in object recognition task (OR), locomotor and exploratory activities, anxiety and pain thresholds. Data are expressed as mean \pm SD of the total time of exploration for OR, number of crossings (open field), the time spent in the open arms (plus maze), and time latency (tail flick). There were no differences between the groups (one-way ANOVA; n = 6-10 per group for all tests). Group numbers represent: 1: young control group; 2: aged control group; 3: exercise aged group; 4: green tea supplementation aged group; 5: exercise and green tea supplementation aged group.

Table 2. Antioxidant defenses and oxidant markers in different brain regions in the different experimental groups (mean \pm SD). Group numbers represent: 1: young control group; 2: aged control group; 3: exercise aged group; 4: green tea supplementation aged group; 5: exercise and green tea supplementation aged group.

PARTE III

DISCUSSÃO

Neste estudo buscamos investigar o potencial antioxidante do chá verde como estratégia para minimizar danos cognitivos associados ao envelhecimento. Para tal, submetemos animais a diferentes intervenções, combinadas, ou não, com o exercício físico, o qual é uma estratégia já amplamente reconhecida como efetiva para minimizar e até mesmo reverter perdas associadas ao envelhecimento. Nossos resultados dos testes cognitivos mostraram que a performance cognitiva decaiu com o processo de envelhecimento, fato esse demonstrado no teste de reconhecimento de objetos (memória de longa duração), ao comparar-se o grupo controle jovem com o grupo controle idoso, e de acordo com estudos prévios (Stoelzel et al., 2002; Assunção et al., 2011).

Como parte de nosso objetivo, mostramos que o exercício físico foi capaz de prevenir esse declínio cognitivo, tanto no grupo que realizou o protocolo de exercício, quanto no grupo que além do exercício físico, recebia suplementação com chá verde. Entretanto, o chá verde isoladamente não foi capaz de prevenir esses déficits. Dessa forma, parece pouco provável que os resultados cognitivos positivos encontrados resultem da ação do chá verde nos animais estudados, que eram saudáveis. Efeito positivo da suplementação com chá verde foi reportado em estudos prévios (Unno et al., 2004; Unno et al., 2007). As razões para as diferentes conclusões destes estudos e do nosso podem ser as diferenças no tempo mínimo de suplementação até que os benefícios do chá sobre o aprendizado e memória sejam efetivos (Haque et al., 2006), e até mesmo diferenças entre espécies, já que alguns estudos utilizam camundongos.

Em estudos que mostraram efeitos positivos do chá verde, como em Rodrigues et al. (2013), foram desenvolvidos 7 meses de suplementação (em nossos estudos foram 3 meses) com chá verde em ratos mais velhos (19 meses, enquanto em nosso estudo os ratos iniciaram a suplementação com 9 meses). Similar comparação pode ser feita com o estudo de Haque et al. (2008), onde a suplementação com chá verde reduziu os danos à memória de ratos causados pelo estresse oxidativo, mas após um tempo maior de consumo do chá (4 meses), mesmo que a concentração tenha sido menor (5g/L em ratos jovens enquanto nós utilizamos 13,33g/L e ratos de meia-idade). Isto sugere que o consumo de chá verde por períodos maiores pode levar a resultados mais significativos sobre o comportamento e o estresse oxidativo. Haque et al. (2006) acresce que o consumo de chá verde por longos períodos de tempo é importante, devido ao fato de que os agentes estressores atuam todos os dias, causando estresse oxidativo diariamente.

No teste da esQUIVA inibitória, relacionado à consolidação de memória aversiva de longo prazo, o exercício trouxe melhoras para o grupo idoso, não havendo efeito da suplementação com chá verde. Observa-se que a maioria dos estudos que apresenta efeitos positivos do chá verde sobre o envelhecimento considerou ratos mais velhos que os nossos. Isso sugere que a suplementação com chá verde pode ser pouco eficiente em animais de meia-idade. Contudo, a suplementação contínua pode ser uma estratégia eficiente, já que Haque et al. (2006) sugerem que os efeitos do chá verde podem aumentar proporcionalmente à idade. Sendo assim, ratos mais velhos e com maior dano oxidativo poderiam se beneficiar mais do tratamento. Os efeitos positivos do exercício são mais consistentes. Radák et al. (2006) relatou melhorias na performance no teste da esQUIVA passiva devido ao treinamento físico, já que exercício pode facilitar ou acelerar a retenção de memória em tarefas relacionadas ao hipocampo (Berchtold et al., 2010), como a esQUIVA inibitória (Radák et al., 2006) e o reconhecimento de objetos (O'Callaghan et al., 2007). Entretanto, assim como o chá verde se

apresenta, nem sempre retenção e aquisição de aprendizado são beneficiadas pelo exercício, demonstrando que seus efeitos são dependentes do tipo e duração do exercício, além da dificuldade da tarefa (Berchtold et al., 2010).

Os benefícios cognitivos relacionados à prática de exercícios físicos são maiores quando existe um período considerável entre o exercício e o teste, sendo que mesmo após uma semana de intervalo ainda se observam grandes benefícios cognitivos, inclusive maiores do que quando o teste era realizado na sequência imediata do treino (Berchtold et al., 2010). Os efeitos do exercício sobre a memória aversiva parecem ligados às características do exercício, condições da tarefa de memória e ao tipo de modelo animal (Lin et al., 2012). Liu et al. (2009) concordam que a intensidade do exercício pode afetar de diversas formas o aprendizado e memória. Isso se dá pelos diferentes efeitos na neuroplasticidade em diferentes regiões cerebrais, que por sua vez podem atuar de diversas formas sobre o aprendizado e a memória (Lin et al., 2012).

Como apresentado em nosso artigo original, os resultados cognitivos estão relacionados aos testes bioquímicos, visto que aumentos no estresse oxidativo podem trazer prejuízos cognitivos. No presente estudo, mostramos que ratos idosos apresentavam menor capacidade antioxidante do que ratos jovens, e esse resultado pode explicar o pior desempenho dos ratos idosos nas tarefas cognitivas. Nos ratos idosos que praticavam exercício físico, e nos que foram suplementados com chá verde, houve um aumento na atividade da glutathione e da glutathione peroxidase, ambas relacionadas às defesas antioxidantes. Esses dados concordam com Panza et al. (2008), que descobriram valores aumentados na concentração sanguínea de glutathione devido ao treinamento físico em humanos, e Somani et al. (1995), que reportaram aumentos na atividade da superóxido dismutase e na glutathione peroxidase no estriado de ratos após o treinamento com exercícios. A atividade aumentada nas enzimas antioxidantes, provavelmente, é parte de um processo

adaptativo em resposta à formação de radicais livres. Entretanto, Radák et al. (2013) não descobriu efeitos do treinamento de corrida em esteira rolante sobre a SOD, CAT e GPx no cérebro de ratos.

Também com base em achados similares, Gerecke et al. (2013) sugere que o exercício pode agir como um neuroprotetor, devido ao aumento na resiliência cerebral frente aos efeitos deletérios do estresse crônico, pelo aumento nos mecanismos antioxidantes, além de outras causas. Coskun, Gonul, Guzel et al. (2005) e Somani et al. (1995) demonstraram efeitos benéficos do treinamento de endurance em esteira rolante no balanço redox do sistema nervoso em ratos.

Buscando evidências que pudessem, em parte, sustentar os achados comportamentais e fundamentar nossas conclusões em relação ao estado cognitivo dos animais ao longo do envelhecimento, parâmetros bioquímicos foram investigados. Avaliamos estes parâmetros para três regiões cerebrais uma vez que a atividade das enzimas antioxidantes pode variar de acordo com a região cerebral, e os efeitos do exercício são também dependentes dessas regiões cerebrais (Radák et al., 2013). Radák et al. (2013) comenta que a resposta da atividade antioxidante devida ao exercício varia de acordo com o tipo, intensidade e duração deste, bem como de acordo com a idade, sexo e tensão a que são submetidos os ratos. Hu et al. (2007) recomendam que o exercício deve ser realizado de forma moderada, como nesse estudo, dado o comportamento em U dos efeitos neurobiológicos do exercício, onde baixas e altas intensidades podem não trazer os efeitos positivos desejados. O exercício regular age como um pré-condicionante frente ao estresse oxidativo, e o acúmulo de dano oxidativo prejudica a função cerebral, e o exercício, em determinadas condições, pode atenuar esse acúmulo, causando redução nos danos (Radák et al., 2001).

Nossos resultados evidenciaram aumentos nas defesas antioxidantes no grupo suplementado com chá verde, concordando com estudos prévios como o de Assunção et al.

(2010), que reportaram níveis de glutathiona e enzimas antioxidantes com alterações favoráveis devido ao consumo de chá durante o envelhecimento. Li et al. (2010), descobriram um efeito preventivo do consumo de chá verde sobre a atividade da Gpx no envelhecimento, tendo suplementado os animais com um consumo médio de 80 mg/kg/dia. Por fim, Xu et al. (2010) sugeriram, que a administração de chá verde a ratos de 20 semanas, em uma diluição de 400 mg/kg/dia aumentou a capacidade antioxidante, reduziu os danos causados por radicais livres as células e reduziu a peroxidação lipídica, tanto no córtex quanto no hipocampo, em modelos de hipoperfusão cerebral crônica, enquanto a concentração de 100 mg/kg/dia apresentou resultados mais modestos. Importante considerar que os estudos mencionados consideraram efeitos do chá verde em suplementações usando animais mais velhos, intervenções mais longas e com doses mais concentradas. Isto reforça o conceito de que os efeitos do chá verde sobre o status antioxidante é variável e dependente de diversos parâmetros da suplementação, diferente do exercício físico, que apresenta efeitos positivos mais consistentes.

Um importante resultado que apresentamos em relação ao consumo de chá verde e o estresse oxidativo foi a redução da atividade de alguns pró-oxidantes. Nossos resultados demonstraram que o consumo de chá verde está relacionado a reduções nas EROs. Conforme apresentado por Assunção et al. (2010), o consumo das catequinas do chá verde atua no combate e remoção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, podendo exercer efeito sobre as enzimas antioxidantes. Haque et al. (2008) relatou redução na peroxidação lipídica e níveis de EROs do hipocampo após administração de chá verde a ratos por longo prazo. Esse resultado é de extrema importância, visto que o declínio da capacidade cognitiva, associado ao envelhecimento, parece ser causado, dentre outros fatores, pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio, que danificam estruturas celulares e impedem seu funcionamento ideal. Haque et al. (2006) estudando ratos jovens (5 semanas de idade), administraram doses de até 5g/L de chá verde por 26 semanas, e verificaram uma redução nas EROs no hipocampo, mas

não no córtex pré-frontal, sugerindo que o hipocampo sofre mais o efeito dessas EROs. Nossos dados também não encontraram resposta significativa no córtex pré-frontal, mas hipocampo e estriado apresentaram resultados significantes, podendo este resultado ser mais um indício de que essas estruturas relacionam-se mais diretamente as EROs.

A peroxidação lipídica não se alterou com o consumo de chá verde. Assunção et al. (2011) e Rodrigues et al. (2013) demonstraram que o consumo do chá verde reduziu a lipoperoxidação, protegendo os animais dos danos oxidativos relacionados ao envelhecimento. Entretanto, eles trabalharam com ratos aos 19 meses de idade, comparando com os de 12 meses (início da velhice) aqui estudados, além do consumo de chá se dar por 7 meses, um tempo consideravelmente maior que o do nosso estudo. Quanto ao exercício, só no córtex pré-frontal nós vimos efeitos sobre TBARS, e esse valor era maior do que os encontrados em todos os outros tratamentos, mostrando um aumento na peroxidação lipídica nesse tecido. A falta de efeito do exercício sobre a peroxidação lipídica que encontramos é semelhante à encontrada por Coskun, Gonul, Guzel et al. (2005), relatando que treinamento crônico com exercícios não afetou significativamente a lipoperoxidação no cérebro.

Em ambos os grupos exercitados, os resultados demonstraram que os valores de EROs eram menores que nos grupos controle, o que pode ser explicado por Gerecke et al. (2013). Estes autores comentam que o exercício tem um efeito protetor sobre o estresse oxidativo e processo inflamatório no cérebro. Radák et al. (2013) acresce que as EROs e as alterações no balanço redox parecem desempenhar um papel importante no mecanismo pelo qual o exercício beneficia a função cerebral e atenua os efeitos deteriorantes no cérebro.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados desse trabalho, podemos concluir que o chá verde não foi eficaz para prevenir os déficits cognitivos associados ao envelhecimento, mas foi eficaz na redução de espécies reativas de oxigênio, melhorando as defesas antioxidantes. Já o exercício físico foi capaz de melhorar todos os parâmetros mensurados, tanto nos testes bioquímicos quanto nos comportamentais. O efeito do chá verde sobre as defesas antioxidantes pode estar relacionada à duração da intervenção, enquanto as reduções nas EROs indicam a existência de efeito mesmo durante uma suplementação de curto prazo.

Apesar de nossos ratos serem de meia-idade, já foi possível observar um déficit cognitivo significativo, o que indica que a perda cognitiva pode se dar de forma contínua, ao longo do processo de envelhecimento. Assim, intervenções buscando inibir essas perdas talvez possam ser realizadas precocemente, com resultados ainda mais satisfatórios.

Quanto ao chá verde, a variedade de resultados diferentes entre os estudos sugere que ainda é preciso um melhor entendimento acerca dos parâmetros que envolvem a suplementação, como a concentração, diluição, tempo e forma de administração, para assim conhecermos a melhor forma de obter os resultados buscados com essa intervenção.

Combinar diversas estratégias antioxidantes, como o exercício e o chá verde, pode não resultar em soma de efeitos antioxidantes, visto que nas tarefas comportamentais apenas o exercício teve efeito, e nas análises bioquímicas, quando o chá verde apresentou efeitos, o exercício também apresentou, ficando difícil identificar quais estratégias estavam agindo em cada momento.

PERSPECTIVAS

A fim de elucidar melhor os mecanismos envolvidos na redução do estresse oxidativo causado pelo exercício físico e pelo chá verde, combinados ou não, a pesquisa nesse tema será continuada, modificando protocolos de exercício, formas de administração do chá e o modelo utilizado. O presente trabalho pode ser continuado como trabalho de doutorado, com subprojetos de iniciação científica e mestrado associados.

REFERÊNCIAS

- ASL, N. A., SHEIKHZADE, F., TORCHI, M. et al. Long-term regular exercise promotes memory and learning in young but not in older rats. *Pathophysiology*. 15: 9-12, 2008.
- ASSUNÇÃO, M., SANTOS-MARQUES, M. J., CARVALHO, F. et al. Chronic green tea consumption prevents age-related changes in rat hippocampal formation. *Neurobiology of aging*. 32: 707-717, 2011.
- ASSUNÇÃO, M. Et al. Green tea averts age-dependent decline of hippocampal signaling systems related to antioxidant defenses and survival. *Free Radical Biology and Medicine*. 48: 831-888, 2010.
- BERCHTOLD, N. C. et al., Exercise and time dependent benefits to learning and memory. *Neuroscience*. 167: 588-597, 2010.
- BÉRUBÉ-PARENT, S. et al. Effects of encapsulated green tea and guarana extracts 25 containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. *British Journal of Nutrition*. 94: 432-436, 2005.
- CHEN, D. Tea polyphenols, their biological effects and potential targets. *Histology and Histopathology*. 23: 487-496, 2008.
- COLCOMBE, S., KRAMER, AF. Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta analytic study. *Psychological Science*. 14(2):125-130, 2003.
- COSKUN, S., GONÜL, B., GÜZEL, N. A. et al. The effects of vitamin C supplementation on oxidative stress and antioxidant content in the brains of chronically exercised rats. *Molecular and cellular biochemistry*. 280: 135-138, 2005.
- COTMAN, C. W. et al. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends in Neuroscience*. 30: 464-472, 2007.

- CRUZAT, V. F. et al. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 13: 336-342, 2007.
- DAFFNER, KR. Promoting successful cognitive aging: a comprehensive review. *Journal of Alzheimers Disease*. 19:1101-1122, 2010.
- DISHMAN, R. K. Et al. Neurobiology of exercise. *Obesity*. 14: 345 – 356, 2006.
- FUKUI, K. et al. Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Annals of New York Academy of Science*. 928: 168-175, 2001.
- GERECKE, K. M. et al. Exercise protects against chronic restraint stress-induced oxidative stress in the cortex and hippocampus. *Brain Research*. 509: 66-78, 2013.
- GOMEZ-PINILLA, F. Brain foods: the effects of nutrients on brain function. *Nature Reviews Neuroscience*. 9:568-578, 2008.
- GOODRIK, C. L. Effects of long-term voluntary wheel exercise on male and female Wistar rats. I. Longevity, body weight and metabolic rate. *Gerontology*. 26: 22-33, 1980.
- HAQUE, A., HASHIMOTO, M., KATADURA, M. et al., Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *Ingestive Behavior and Neurosciences*. 136: 1043-1047, 2006.
- HAQUE, A., HASHIMOTO, M., KATADURA, M. et al., Green tea prevent cognitive deficits caused by Aβ1-40 in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 19: 619-626, 2008.
- haramizu et al 2013 ou 2011
- HILLMAN, C. H. Et al., Be smart, exercise your heart: exercise effects on brain and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*. 9: 58-65, 2008.
- HU, G. et al. Coffee and tea consumption and the risk of Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 22: 2242-2248, 2007.

HUANG, A. M., et al. Compulsive exercise acutely upregulates rat hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neural Transmission*. 113: 803-811, 2006.

JÓWKO, E. et al. Effect of a single dose of green tea polyphenols on the blood markers of exercise-induced oxidative stress in soccer players. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 22:486-496, 2012.

JÓWKO, E. et al. Green tea extract supplementation gives protection against exercise-induced oxidative damage in healthy men. *Nutrition Research*. 31:813-821, 2011.

LI, Q. et al. Chronic green tea catechins administration prevents oxidative stress-related brain aging in C57BL/6J mice. *Brain Research*. 1353: 28-35, 2010.

LIN, T. W. Et al. Different types of exercise induces differential effects on neuronal adaptations and memory performance. *Neurobiology of Learning and Memory*. 97: 140-147, 2012.

LIU, y. F. et al. Differential effects of treadmill running and wheel running on spatial or aversive learning and memory: roles of amygdalar and brain-derived neurotrophic factor and synaptotagmin I. *The journal of physiology*. 587(13): 3221-3231, 2009.

MENDEL, S. A. et al. Cell Signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG). *Journal of Alzheimer Disease*. 15: 211-222, 2008.

MORILAS-RUIZ, J. M., et al., Effects of polyphenolic antioxidants on exercise-induced oxidative stress. *Clinical Nutrition*. 25: 444-453, 2006.

MURASE, T. Et al. Tea catechin ingestion combined with habitual exercise suppressed the aging-associated decline in physical performance in senescence-accelerates mice. *American Journal of physiology: Regulatory, integrative and comparative physiology*. 295:281-289, 2008.

- NETTO, J. J. et al. Comportamento da produção de espécies reativas de oxigênio em miocárdio de ratos submetidos a treinamento de baixa intensidade em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 13: 411-415, 2007.
- OLIVEIRA, M. C. e SCHÖFFEN, J. P. F. Oxidative Stress Action in Cellular Aging. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 53: 1333-1342, 2010.
- OMS. Life in the 21st century: a vision for all (Relatório Mundial de Saúde,1998) Genebra: Organização Mundial da Saúde. Acesso em: 21/09/2012. Disponível em http://www.who.int/whr/1998/en/whr98_en.pdf
- OTA, N. et al., tea catechins prevent contractile dysfunction in unloaded murine soleus muscle: a pilot study. *Nutrition*. 27: 955-999, 2011.
- PIETRELLI, A. et al. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged and old rats. *Neuroscience*. 202: 252-266, 2012.
- van PRAAG, H. Neurogenesis and exercise: past and future directions. *Neuromolecular Medicine*. 10:128-140, 2008.
- PRADA, F. J. A. et al. Oxidative Stress During Rehabilitation from Protein Malnutrition Associated with Aerobic Exercise in Rats. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 50: 45-55, 2007.
- RADÁK, Z. et al. The complex role of physical exercise and reactive oxygen species on brain. *Journal of Sports and Health Science*. 2: 87-93, 2013.
- RADÁK, Z., CHUNG, HY, GOTO, S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology*. 6:71-75, 2005.
- REBELATTO, J. R. et al. Antioxidantes, Atividade Física e Estresse Oxidativo em Mulheres Idosas. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. 14: 8-11, 2008.
- RODRIGUES, J. et al. Protective effects of a catechin-rich extract on the hippocampal formation and spatial memory in aging rats. *Behavioral Brain Research*. 246: 94-102, 2013.

- ROSSOUW, J. E. Prescribing postmenopausal hormone therapy to women in their 50s in the post-women's health initiative era. *Maturitas*. 65(3): 179-180, 2010.
- SENGER, A. E. V., SCHWANKE, C. H. A. e VALLE GOTTLIEB, M.G. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. *Scientia Medica*. 20: 292-300, 2010.
- SERRANO, F. e KLANN, E. Reactive oxygen species and synaptic plasticity in the aging hippocampus. *Ageing Research Reviews*. 3: 431-443, 2004.
- SCHNEIDER, C., SEGRE, T. Green tea: potential health benefits. *Complementary and Alternative Medicine*. 79(7): 591-594, 2009.
- SOMANI, S. M. et al. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 50: 635-639, 1995.
- STOELZEL, C. R. Et al. The effects of aging and dorsal hippocampal lesions: performance on spatial and nonspatial comparable version of the water maze. *Neurobiology of learning and memory*. 78: 217-233, 2002.
- TEIXEIRA, I. N. D. O. e GUARIENTO, M. E. Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. *Ciência e Saúde Coletiva*. 15: 2845-2857, 2010.
- UNNO, K. Et al. Daily consumption of green tea catechin delays memory regression in aged mice. *Biogerontology*. 8: 89 – 95, 2007.
- UNNO, K. Et al. Suppressive effect of green tea catechins on morphologic and functional regression of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10). *Experimental Gerontology*. 39: 1027 – 1034, 2004.
- WANG, Y. et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) promotes neural progenitor cell proliferation and sonic hedgehog pathway activation during adult hippocampal neurogenesis. *Molecular Nutrition and Food Research*. 56: 1292-1303, 2012.

XU. Y., ZHANG, J., XIONG, L. Et al., Green tea polyphenols inhibit cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion via modulating oxidative stress. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 21: 741-748, 2010.

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

Data: 22 de Março de 2013

PROTOCOLO N° 042/2012

Pesquisador: FELIPE PIVETA CARPES

Campus: Uruguaiana

Telefone: : (55) 3413 4321 ramal 4812

Título: EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO E DA SUPLEMENTAÇÃO COM CHÁ VERDE EM CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E COMPORTAMENTAIS ASSOCIADAS AO ENVELHECIMENTO.

E-mail: felipecarpes@gmail.com

Após a análise detalhada do projeto de pesquisa a relatoria do CEUA-Unipampa emite parecer **FAVORÁVEL** para o cadastro do protocolo e execução do referido projeto.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Luiz E. Henkes'.

Luiz E. Henkes
Professor Adjunto
Coordenador do CEUA/Unipampa