



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS – UNESP/SBFis**

JÚLIA ZANUTO DOURADINHO

**SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO COMO
ESTRATÉGIA PARA ATENUAR AS ALTERAÇÕES
FISIOLÓGICAS DURANTE O ENVELHECIMENTO
FEMININO: EVIDÊNCIAS EM RATAS SENIS**

**ARAÇATUBA
2026**

JÚLIA ZANUTO DOURADINHO

**SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO COMO
ESTRATÉGIA PARA ATENUAR AS ALTERAÇÕES
FISIOLÓGICAS DURANTE O ENVELHECIMENTO
FEMININO: EVIDÊNCIAS EM RATAS SENIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

ARAÇATUBA

2026

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

D739s Douradinho, Júlia Zanuto.
Suplementação com probiótico como estratégia para
atenuar as alterações fisiológicas durante o envelheci-
mento feminino : evidências em ratas senis / Júlia Za-
nuto Douradinho. - Araçatuba, 2026
84 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Odontologia, Araçatuba
Orientadora: Profa. Rita Cássia Menegati Dornelles

1. Perimenopausa 2. Eixo-intestino-cérebro 3. Probió-
ticos 4. Sistema imunitário 5. Estresse oxidativo I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

FOLHA DE APROVAÇÃO

Júlia Zanuto Douradinho

SUPLEMENTAÇÃO COM PROBIÓTICO COMO ESTRATÉGIA PARA ATENUAR AS ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS DURANTE O ENVELHECIMENTO FEMININO: EVIDÊNCIAS EM RATAS SENIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

Aprovada em 29/05/2026

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. **Rita Cássia Menegati Dornelles**

Instituição: Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof^a. Dr^a. **Kelse Tibau de Albuquerque**

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof^a. Dr^a. **Marina Prigol**

Instituição: Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 19.06.1999, Penápolis – SP

Filiação: Neila Zanuto Douradinho
José Lopes Douradinho

2017/2021: Curso de Graduação em Nutrição Bacharelado pela Universidade Paulista (UNIP), Araçatuba – SP.

2023/2026: Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (FOA) – Araçatuba – SP – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas – Sociedade Brasileira de Fisiologia.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, por iluminar meu caminho e tornar possível a realização deste sonho. Foi Ele quem me concedeu forças para seguir em frente, serenidade nos momentos de aflição, sabedoria para enfrentar cada desafio e inúmeras oportunidades ao longo dessa caminhada.

Aos meus pais, José Lopes Douradinho e Neila Zanuto Douradinho, e ao meu irmão, Gabriel Zanuto Douradinho, que são o alicerce da minha vida, minha fortaleza e meu porto seguro. Nada disso seria possível sem o amor incondicional, o incentivo, os ensinamentos e o apoio que sempre me ofereceram. Esta foi uma jornada longa, desafiadora e repleta de obstáculos, mas jamais caminhei sozinha, pois sempre pude contar com vocês. Obrigada por acreditarem em mim, por cada renúncia, por todo esforço e por investirem, incansavelmente, no meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu amor e companheiro de vida, Gabriel Henrique dos Santos Monteiro, por estar ao meu lado em todos os momentos, especialmente nos mais difíceis. Obrigada por me fortalecer quando pensei em desistir, por acolher minhas angústias, enxugar minhas lágrimas, celebrar minhas conquistas e enfrentar comigo cada desafio desta caminhada. Seu carinho, paciência, apoio incondicional e dedicação foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Levarei comigo, para sempre, toda a sua entrega e o amor com que tornou esse percurso mais leve.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas e a Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis) pela oportunidade e o privilégio de realizar o Mestrado.

Ao Diretor da FOA / UNESP, Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem e pelo Vice Diretor Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra pelo apoio.

À Seção Técnica de Pós-Graduação, em especial Cristiane Regina Lui Matos pelo empenho em me atender e auxiliar.

À Seção Técnica de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (STAEPE) por toda prontidão e suporte.

A todos do Departamento de Ciências Básicas, incluindo professores, discentes, pessoal da administração e manutenção do prédio. Obrigada por cada suporte, colaboração, aprendizado, conversa e bons momentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. A todos os funcionários da UNESP.

Muito obrigada a todos!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha família, em especial ao meu pai, José Lopes Douradinho, meu maior alicerce, à minha mãe, Neila Zanuto Douradinho, e ao meu irmão Gabriel Zanuto Douradinho, dedico minha profunda gratidão. Obrigada por acreditarem em mim, mesmo nos momentos em que o caminho parecia incerto, e por nunca permitirem que eu desistisse dos meus sonhos. O amor, o apoio incondicional e o incentivo de vocês foi o que me sustentou em cada etapa desta jornada. Esta conquista não é apenas minha, mas de vocês também. Cada pagina deste trabalho carrega um pouco do amor, da dedicação e da confiança que sempre depositaram em mim. Amo vocês e serei eternamente grata por tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim.

Ao meu noivo, Gabriel Henrique dos Santos Monteiro, expresso minha mais sincera gratidão por caminhar ao meu lado durante toda essa jornada. Obrigada por por sempre acreditar em mim, por me incentivar mesmo nos momentos mais difíceis e por ser meu porto segura, ainda que a distância. Sua paciência, seu amor e seu carinho foram essenciais para que eu encontrasse forças para seguir em frente. Esta conquista também carrega um pouco de você. Muito obrigada por tornar essa caminhada mais leve e por nunca deixar que eu duvidasse da minha capacidade. Amo você e muito obrigada.

À minha avó, Heda Ambrósio Zanuto, por todo o carinho, incentivo e apoio ao longo desta caminhada. Muito obrigada.

À minha orientadora, Profa. Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles, minha profunda gratidão por toda paciência, dedicação ao compartilhar seus conhecimentos. Obrigada pelas conversas, ensinamentos e por sempre estar disponível para me orientar e oferecer o suporte necessário nos momentos em que mais precisei. Levarei comigo todos os aprendizados e exemplos que recebi durante essa trajetória. Muito obrigada.

À minha parecerista, Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira, que foi uma pessoa ímpar para o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal ao longo do mestrado. Obrigada por todos os ensinamentos compartilhados, pelos conselhos, pelas conversas e pelo incentivo constante. Sua generosidade, acolhimento e dedicação fizeram toda diferença nesta trajetória. Sou imensamente grata por sua

presença e por tudo o que aprendi com a senhora. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves-Neto, minha sincera e profunda gratidão por toda atenção, disponibilidade e generosidade ao longo desta trajetória. Obrigada por ter sido tão prestativo e acolhedor comigo e com as minhas colegas. Sou imensamente grata pelos ensinamentos, conversas, conselhos e por todo suporte que contribuíram de forma tão significativa para esta caminhada. Sua dedicação e disposição em ajudar fizeram toda a diferença. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Edilson Elvorino, por todo o suporte, pelos ensinamentos e pela dedicação durante as análises citológicas. Agradeço por toda a contribuição para o meu aprendizado. Muito obrigada.

À minha colega Thainá Daguane Esperança, que se tornou uma pessoa muito especial ao longo dessa caminhada. Obrigada por todos os ensinamentos, pelo apoio, incentivo e por estar presente em tantos momentos. Muito obrigada.

À minha prima, Luana Galante Douradinho, que me apresentou o mestrado e teve um papel muito importante no início dessa trajetória. Obrigada por todo o incentivo e apoio. Muito obrigada.

À minha colega Débora Prazias Cavalcante, por todo o suporte, parceria e ajuda ao longo dessa caminhada. Muito obrigada.

À minha colega Livia Villas Boas, que, ainda nos primeiros meses do mestrado, me fez enxergar uma luz no fim do túnel e me incentivou a seguir em frente. Muito obrigada.

Ao Thales Polizel e ao Lucas Custódio, por toda a paciência, disponibilidade e apoio durante as minhas análises citológicas. Muito obrigada.

Às minhas colegas de laboratório, Beatriz Procópio Stringhetti e Isabella Ribeiro Pradella, e a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão desta etapa. Meu sincero agradecimento!

A todos os integrantes do LaFEE, pela parceria, convivência e colaboração ao longo desses anos. Muito obrigada.

“Quanto mais sabemos, mais percebemos o quanto ainda há por conhecer.”

Autor desconhecido.

DOURADINHO, J. Z. **Suplementação com probiótico como estratégia para atenuar as alterações fisiológicas durante o envelhecimento feminino: evidências em ratas senis.** 2026. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - Sociedade Brasileira de Fisiologia – SBFis, Araçatuba – SP, 2026.

RESUMO

O envelhecimento feminino, particularmente durante a transição que marca o fim do período reprodutivo, afeta a microbiota intestinal, o equilíbrio redox, a função imunológica e o desempenho motor e cognitivo. Estratégias direcionadas ao eixo intestino-cérebro têm emergido como abordagens promissoras para atenuar esses efeitos. Este estudo investigou se a suplementação com probióticos, administrada durante o período de transição reprodutiva, poderia influenciar o eixo intestino-cérebro, por meio da avaliação da morfologia intestinal, de marcadores de estresse oxidativo e de parâmetros comportamentais. Ratas fêmeas cíclicas (8 meses de idade) e ratas fêmeas em periostropausa (23 meses de idade) receberam solução salina ou suplementação com o probiótico VSL#3 durante 42 dias. Os resultados demonstraram que a suplementação com probióticos exerceu efeitos que variaram de acordo com a condição fisiológica associada ao envelhecimento reprodutivo, atuando predominantemente sobre vias fisiológicas periféricas. O VSL#3 melhorou a integridade da mucosa intestinal em todo o intestino delgado e reduziu a degranulação de mastócitos mesentéricos em ratas senis. Esses efeitos foram acompanhados pela atenuação do estresse oxidativo sistêmico, mas não por alterações nos parâmetros redox do hipocampo. Além disso, essas adaptações periféricas estiveram associadas à redução de comportamentos do tipo ansioso e à melhora do desempenho locomotor. Em contraste, a suplementação com probióticos não melhorou a memória de reconhecimento de objeto novo nem modificou o estado redox hipocampal, indicando dissociação entre as respostas periféricas e centrais. De modo geral, esses achados sugerem que os efeitos benéficos do VSL#3 estão principalmente associados a adaptações periféricas, incluindo a melhora da integridade intestinal, a redução da ativação de mastócitos e a atenuação do estresse oxidativo sistêmico, fatores que podem contribuir para a redução de comportamentos do tipo ansioso e para a melhora do desempenho locomotor, enquanto exercem efeitos limitados sobre o equilíbrio redox do hipocampo e a função cognitiva.

Palavras-chave: Perimenopausa. Eixo-intestino-cérebro. Probiótico. Sistema imune. Estresse oxidativo.

DOURADINHO, J. Z. **Probiotic Supplementation as a Strategy to Attenuate Physiological Changes During Female Aging: Evidence from Aged Female Rats.** 2026. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas - Sociedade Brasileira de Fisiologia – SBFis, Araçatuba – SP, 2026.

ABSTRACT

Female aging, particularly during the transition marking the end of the reproductive period, affects gut microbiota, redox balance, immune function, and motor and cognitive performance. Strategies targeting the gut-brain axis have emerged as promising approaches to mitigate these effects. This study investigated whether probiotic supplementation administered during the reproductive transition period could influence the gut-brain axis, evaluating intestinal morphology, oxidative stress markers, and behavioral parameters. Cycling female rats (8 months old) and female rats undergoing periestropause (23 months old) received either saline solution or probiotic supplementation (VSL#3) for 42 days. The results demonstrate that probiotic supplementation exerted effects that varied according to the physiological condition associated with reproductive aging, acting predominantly on peripheral physiological pathways. VSL#3 improved intestinal mucosal integrity throughout the small intestine and reduced mesenteric mast cell degranulation in senile female rats. These effects were accompanied by attenuation of systemic oxidative stress but not by changes in hippocampal redox parameters. Moreover, these peripheral adaptations were associated with reduced anxiety-like behaviors and improved locomotor performance. In contrast, probiotic supplementation did not improve novel object recognition memory or modify hippocampal oxidative status, indicating a dissociation between peripheral and central responses. Overall, these findings suggest that the beneficial effects of VSL#3 are mainly associated with peripheral adaptations, including improved intestinal integrity, reduced mast cell activation, and attenuation of systemic oxidative stress, which may contribute to reduced anxiety-like behaviors and enhanced locomotor performance, while exerting limited effects on hippocampal oxidative balance and cognitive function.

Keywords: Perimenopause. Gut-brain axis. Probiotic. Immune System. Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Visão geral do eixo-microbiota-cérebro	25
Figura 2 – Composição do sistema imunológico intestinal	29
Figura 3 – Delineamento experimental	32
Figura 4 – Incidência das fases do ciclo estral	41
Figura 5 – Consumo alimentar e hídrico de ratas Wistar adultas e senis	43
Figura 6 – Variáveis morfométrica do intestino delgado de ratas Wistar adultas e senis	46
Figura 4 – Coloração com hematoxilina e eosina (HE) no intestino delgado de ratas Wistar adultas e senis	47
Figura 6 -Análise quantitativa e qualitativa de células mastócitos no tecido mesentérico após coloração com azul de toluidina	49
Figura 7 – Marcadores do estado redox plasmático	52
Figura 8 – Marcadores do estado redox hipocampal	54
Figura 9 – Análise temporal do teste de labirinto em cruz elevado	56
Figura 10 – Análise etológica do teste de labitindo em cruz elevado	57
Figura 11 – Análise temporal do teste de campo aberto	58
Figura 10 – Análise etológica do teste de campo aberto	59
Figura 13 – Análise do reconhecimento de objetos	60
Figura 14 – Análise do teste de deambulação	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso corporal de ratas Wistar adulta e idosas	42
Tabela 2 - Peso de útero e ovários de ratas Wistars	42

LISTA DE SIGLAS

α – Alfa

Ach – Acetilcolina

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

β – Beta

BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE – Barreira hematoencefálica

BSA – Bovine Serum Albumine

CAT – Catalase

CCK – Colescistocinina

CE – Células enteroendócrinas

CRH – Hormônio liberador de corticotropina

CS – Circulação sistêmica

D – Diestro

DA – Dopamina

DA – Doença de Alzheimer

DCV – Doenças cardiovasculares

DM2 – Diabetes mellitus tipo 2

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNPH – Dinitrofenilhidrazina

DTNB – Ácido 2-nitrobenzóico

E – Estro

E₂ – 17 β -estradiol

EPM – Erro padrão da média

EO – Estresse oxidativo

ER α – Receptor de estrogênio alfa

ER β – Receptor de estrogênio beta

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FRAP – Ferric reducing antioxidant power

FSH – Hormônio folículo estimulante

g – Gramas

GABA – Ácido gama-aminobutírico

GALT – *Gut-Associated Lymphoid Tissue*

GLP-1 – Peptídeo semelhante ao glucagon tipo

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

GPx – Receptor de estrogênio acoplado à proteína G

GPx – Glutathione peroxidase

GR – Glutathione reductase

GSH – Glutathione

GSSG – GSH oxidado

5-HT – 5-hidroxitriptamina

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

HHGO – Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas-óvarios

HPA – Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

IBGE – Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ID – Intestino Delgado

IL-1 α – Interleucina 1 alfa

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IL-4 – Interleucina 4

LH – Hormônio luteinizante

LPS – Lipopolissacarídeo

LTP – Potenciação de longa duração

JE – Junções estreitas

MCs – Mastócitos

M – Metaestro

mM – miliMol

min – minutos

mg – Miligramas

mol/L – Mol por litro

NaOH – Hidróxido de sódio

NA – Noradrenalina

NF- κ B – Fator nuclear kappa B

NPY – Neuropeptídeo Y
nm – Nanômetro
OMS – Organização Mundial da Saúde
O₂ – Oxigênio
P – Proestro
p – Nível descritivo ou probabilidade de significância
PC – Proteína carbonilada
PG – Peptidoglicano
pH – Potencial hidrogênico
PNAD – Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios
PRRs – *Pattern Recognition Receptors*
PT – Proteína total
PYY – Peptídeo YY
SNC – Sistema Nervoso Central
SNE – Sistema Nervoso Entérico
SI – Sistema imunológico
SOD – Superóxido dismutase
STRAW – *Stages of Reproductive Aging Workshop*
TAC – Capacidade antioxidante total
TBARs - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA – Ácido tricloroacético
tGSH – GSH reduzido + GSSG oxidado
TGI – Trato gastrointestinal
TGF-β – Fator de crescimento transformador beta
TI – Trato Intestinal
TLR-4 – *Receptor Toll-like 4*
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
VE – Vias espinais
μmol/L – Micro mol por litro

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	12
LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE SIGLAS.....	15
1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 METODOLOGIA.....	31
3.1 Animais	31
3.2 Grupos experimentais.....	31
3.3 Intervenção	32
3.4 Ingestão alimentar e ingestão hídrica	33
3.5 Coleta e armazenamento de amostras de tecido.....	33
3.5.1 Eutanásia por decapitação	33
3.5.2 Coloração por Hematoxilina e Eosina (HE).....	34
3.5.3 Análise de mastócitos no mesentério intestinal	34
3.5.5 Análise do estado redox do hipocampo e do plasma	35
3.5.5.1 Preparação do homogenato de tecido hipocampal.....	35
3.5.5.2 Determinação do dano oxidativo proteico e lipídico no hipocampo e no plasma	36
3.5.5.3 Determinação da defesa antioxidante não-enzimática no hipocampo e no plasma	36
3.5.5.4 Determinação da defesa antioxidante enzimática no hipocampo e no plasma	36
3.6 Testes cognitivos e funcional.....	37
3.6.1 Teste de Labirinto em cruz elevado.....	38
3.6.2 Teste de campo aberto	38

3.6.3 Teste de reconhecimento de objetos	39
3.6.4 Teste de deambulação	40
3.7 Análises Estatísticas	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Parâmetros Gerais	41
4.2 Ingestão alimentar e hídrica.....	42
4.3 Análise morfométrica do intestinal delgado utilizando coloração por hematoxilina-eosina (HE).....	43
4.4 Análise citológica dos mastócitos no mesentério intestinal	47
4.5 Análises bioquímicas	50
4.5.1 Estado redox do plasma	50
4.5.2 Estado redox do hipocampo	52
4.6 Análise comportamental	54
4.6.1 Labirinto em Cruz Elevado.....	54
4.6.2 Campo aberto	57
4.6.3 Teste de reconhecimento de objetos	59
4.6.4 Teste de deambulação	60
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÃO.....	69
7 REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO A – Comitê de Ética	85

1 INTRODUÇÃO

O envelhecimento biológico é marcado pelo declínio progressivo das funções corporais, associado à redução da capacidade de manutenção e reparo tecidual, resultando em comprometimento de mecanismos celulares essenciais à homeostase, elevando a vulnerabilidade do organismo e diminuindo sua capacidade adaptativa ao longo do tempo (LI *et al.*, 2024). Evidências apontam causas multifatoriais para o processo natural do envelhecimento, incluindo fatores intrínsecos associados a fragilidade do trato gastrointestinal (TGI), comprometimento do sistema imunológico (ZHANG *et al.*, 2023), desequilíbrio do estado redox e alterações neurais (ALHAZZA *et al.*, 2026).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) projeta que a população mundial com 60 anos ou mais poderá atingir 2,1 bilhões até 2050, e cerca de 3,2 bilhões até 2100, cenário que impõe desafios crescentes à saúde pública. Embora o envelhecimento constitua processo cronológico universal, suas manifestações e impactos são influenciados por determinantes sociais e biológicos, incluindo o gênero. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a partir da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), indicam que, em 2021, as mulheres representavam a maioria da população idosa, correspondendo a 55,8% (17,4 milhões), enquanto os homens totalizavam 44,2% (13,8 milhões), mantendo-se esse predomínio feminino ao longo da última década (IBGE; PNAD, 2022). Esse cenário também é observado globalmente, com estimativas apontando que, até 2030, mais de 1,2 bilhão de mulheres terão 50 anos ou mais, podendo vivenciar aproximadamente um terço de suas vidas no período pós-menopausa (BRITON *et al.*, 2012).

O sistema reprodutor feminino é um dos primeiros sistemas do organismo a apresentar sinais de envelhecimento, com comprometimento funcional iniciado antes de outros órgãos (BALOUGH *et al.*, 2025). Esse processo é caracterizado pela transição progressiva de ciclos reprodutivos regulares para irregulares, seguida pela aciclicidade e, por fim, cessação da fertilidade (CAMAIONI *et al.*, 2022). De acordo com a classificação do estadiamento do envelhecimento reprodutivo definido pela Stages of Reproductive Aging Workshop (STRAW) + 10 (2012), a senescência reprodutiva feminina é dividida em estágios bem definidos. A menopausa atua como

marco central dessa escala, delimitando as fases pré-menopausa, que incluem a menarca, o período reprodutivo e a perimenopausa, e de pós-menopausa, a qual é subdividida em fases precoce e tardia (HARLOW et al., 2012).

A ciclicidade ovariana compreende o intervalo entre a puberdade e a menopausa, fase caracterizada por oscilações hormonais que se estabelecem ao longo do período reprodutivo feminino (LIU; GAO, 2023). Em mulheres adultas, a flutuação cíclica de 17β -estradiol (E_2), progesterona, hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) caracteriza o ciclo menstrual, que apresenta duração média de 28 dias (BARBIERI, 2014). A regulação desse processo depende da coordenação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG). O hipotálamo sintetiza e secreta o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), principal regulador do eixo reprodutivo, que estimula a hipófise anterior a liberar FSH e LH (CASATI et al., 2023). Em resposta, os ovários produzem estrogênio e progesterona, responsáveis pelo desenvolvimento folicular, ovulação e preparação endometrial, além da produção de inibinas, ativinas e outros fatores parácrinos que refinam o controle reprodutivo (HAN et al., 2023).

Roedores fêmeas apresentam flutuações hormonais ao longo da vida reprodutiva, semelhantes às observadas em mulheres. No entanto, nesses animais os ciclos reprodutivos são mais curtos e dinâmicos, com duração média de quatro a cinco dias, o que os torna modelos experimentais adequados para investigar alterações fisiológicas que ocorrem durante esse período (MARCONDES; BIANCHI; TANNO, 2002, FREEMAN, 1997). Similar ao que ocorre em seres humanos, os roedores apresentam, com o avançar da idade, transição reprodutiva análoga à perimenopausa, denominada periestrofopausa, marcada por irregularidade no ciclo estral, redução da fertilidade e diminuição progressiva da responsividade estrogênica (FINCH, 2014). Essas alterações estão associadas a modificações no eixo HHG, que sofre mudanças estruturais e funcionais ao longo do envelhecimento reprodutivo (NICOLA et al., 2016).

Em mulheres, a perimenopausa ocorre, em geral, entre os 45 a 55 anos de idade e é caracterizada por irregularidade dos ciclos menstruais, redução progressiva da reserva folicular ovariana e flutuações nas concentrações hormonais de E_2 , progesterona, FSH e LH que refletem instabilidade funcional do eixo (BRINTON et al., 2015). Essa transição hormonal, por sua vez, repercute tanto em tecidos reprodutivos como não reprodutivos, contribuindo para o surgimento de diversas manifestações clínicas (CHEN, 2022). O impacto da perimenopausa envolve importantes alterações

neuroológicas, uma vez que o E₂ contribui continuamente para o desenvolvimento e dinâmica funcional encefálica ao longo da vida (HERSON; KULKARNI, 2022; BACON; BRINTON, 2021). Esse conjunto de manifestações decorrente de alterações hormonais desregulam a produção de citocinas inflamatórias como interleucina-1 α (IL-1 α), interleucina-1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), capazes de migrar pela circulação sistêmica e atingir o SNC, desencadeando ativação de células gliais, como micróglia e astrócitos (MALUTAN et al., 2014; MCCARTHY; RAVAL, 2020). Essa cascata inflamatória contribui o estabelecimento de processos neuroinflamatórios, neurodegenerativos e rearranjo dos circuitos límbicos pré-frontais (MARANO et al., 2026; GUO et al., 2025), capaz comprometer a plasticidade sináptica, o que favorece disfunções cognitivas e emocionais (MOTTAHEDIN et al., 2017). Como consequência, essas modificações podem emergir em alterações hipotalâmicas, como ondas de calor, distúrbios do sono, fadiga crônica, entre outras disfunções vasomotoras (DAVIS et al., 2023). A diminuição dos efeitos neuroprotetores do E₂ pode levar a impactos psicológicos negativos em algumas mulheres. Além disso, o envelhecimento está associado a alterações físicas, declínio de funções corporais e transformações na percepção da feminilidade (HERSON; KULKARNI, 2022; LIZCANO; GUZMÁN, 2014).

A redução das concentrações de E₂, característica de fases tardias da perimenopausa, compromete a regulação de processos fisiológicos por meio da modulação de vias clássicas de receptores intracelulares estrogênicos alfa e beta (ER α , ER β), bem como pela via não clássica, via receptor de estrogênio acoplado à proteína G (GPER) (SINGH; PARAMANIK, 2022). O hipocampo apresenta alta densidade de receptores estrogênicos (SHEPPARD et al., 2019) e essa sinalização exerce modulação de processos de memória e aquisição de informações (aprendizagem) (FINNEY et al., 2019). A ativação desses receptores promove aumento da densidade de espinhas dendríticas, potencializa a função dos receptores ionotrópicos de glutamato (BENDIS et al., 2024) e indução a potenciação de longa duração (LTP) (CAYA-BISSONNETTE; BÉÏQUE, 2024). O fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é regulado pela sinalização estrogênica e atua diretamente na sobrevivência neuronal, sendo mediador essencial da LTP (BUSTAMANTE-BARRIENTOS et al., 2021). Esse mecanismo favorece o fortalecimento e a estabilização das conexões sinápticas, processos essenciais para a formação e consolidação da memória de longo prazo (FLANNERY et al. 2025). Entretanto, a

dinâmica sináptica hipocampal não depende exclusivamente da neurotransmissão glutamatérgica, podendo envolver a interação em diferentes sistemas de neurotransmissores, incluindo noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), dopamina (DA) e ácido γ -aminobutírico (GABA) (PALACIOS-FILARDO; MELLOR, 2019). Essa rede multitransmissora garante precisão refinada da função neural, tornando esses processos suscetíveis a influências sistêmicas (QU et al., 2024).

Estados ansioso e depressivos estão associados a prejuízos cognitivos em memória episódica, atenção sustentada, velocidade de processamento e autorregulação de processos mentais (AIMONE et al., 2014). Embora a etiologia da ansiedade envolva causas multifatoriais, sabe-se que há correlação dinâmica entre fatores hormonais, inflamatórios e ambientais (XI et al., 2025; DENTZER et al., 2016). A interrupção de vias serotoninérgicas e dopaminérgicas reguladas pelo E_2 (BENDIS et al., 2024), inflamação sistêmica (MARANO et al., 2026) e disfunções em circuitos hipocampais estão envolvidos no surgimento desses sintomas (CHO et al., 2025). A ativação do eixo hipotálamo-hipofise-adrenal (HPA), caracterizada pela elevação de cortisol em situações de estresse ou ameaça, atua como fator central na fisiopatologia dessas manifestações clínicas, amplificando vulnerabilidades límbicas (LIANG et al., 2024).

O estresse oxidativo também tem sido apontado como fator importante no declínio cognitivo associado ao envelhecimento (BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019). Com o avanço da idade, ocorre o acúmulo progressivo de falhas no funcionamento celular, inclui processos como instabilidade genômica, encurtamento de telômeros, perda de proteases, disfunção mitocondrial e falha no processo de eliminação de moléculas, entre outros (LÓPEZ-OTÍN et al., 2023). Esses processos contribuem para a deterioração da homeostase celular e favorecem o estabelecimento de ambiente pró-oxidante, caracterizado pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e redução da capacidade antioxidante, decorrente da disfunção mitocondrial (AMORIN et al., 2022). A persistência desses danos está diretamente associada à fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (KANDLUR; SATYAMOORTHY; GANGADHARAN, 2020) e sistêmicas associadas ao envelhecimento, incluindo doenças cardiovasculares (WANG; KANG, 2020), doenças musculoesqueléticas (JACKSON, 2016), síndrome metabólica (KLISIC et al., 2024), doença inflamatória intestinal (TIAN; WANG; ZHANG, 2017) e câncer (IQBAL et al., 2024). O E_2 exerce efeitos antioxidantes no SNC, contribuindo para a redução de ERO

e para o aumento da expressão de enzimas antioxidantes (BOURGONJE et al., 2020). No entanto, durante a transição reprodutiva, a redução estrogênica favorece o acúmulo de radicais livres e danos oxidativos em estruturas neurais, comprometendo a expressão de BDNF, contribuindo para distúrbios neuropsiquiátricos (BUSTAMANTE-BARRIENTOS et al., 2021, SCHARFMAN; MACLUSKY, 2006)

Assim, compreender os mecanismos que conectam os sistemas endócrino, imune e neural torna-se essencial para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas direcionadas ao envelhecimento feminino. Nos últimos anos, consolidou-se o conceito do eixo microbiota-intestino-cérebro, sistema de comunicação bidirecional, na qual os microrganismos intestinais transmitem sinais ao cérebro e, simultaneamente, o cérebro envia informações ao intestino (MORAIS; SCHREIBER; MAZMANIAN, 2021). Esse eixo é coordenado por sinais metabólicos, neurais, imunológicos e endócrinos (Figura 1). A sinalização pelas vias neurais, ocorre especialmente por meio do sistema nervoso entérico e nervo vago; vias endócrinas, medidas pela secreção de hormônios entéricos e pelo eixo HPA; vias metabólicas, por meio da mediação de metabólitos microbianos bioativos como ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e vias imunológicas, envolvendo citocinas e células efectoras de resposta inflamatória (RUSCH; LAYDEN; DUGAS, 2023; ABILDINOVA et al., 2024).

O trato intestinal (TI) atua como interface ampla entre o meio externo e o ambiente interno, abrigando microbiota diversa composta por trilhões de microrganismos (bactérias, fungos e vírus) que integrem simbioticamente com o hospedeiro (ADAK; KHAN, 2019). A microbiota intestinal, tanto em humanos quanto em roedores, é predominantemente composta por dois grandes filos bacterianos: *Firmicutes*, constituído em grande parte de bactérias Gram-positivas, e *Bacteroidetes*, formado principalmente de bactérias Gram-negativas (SPILIJAR; MERKLER; TRAJKOVSKI, 2017). Alterações na proporção entre esses grupos tem sido associadas a diferentes condições metabólicas, como diabetes mellitus tipo 2 (DM2), obesidade (LIU et al., 2025) e transtornos gastrointestinais (ZHANG et al., 2026). No entanto, evidências recentes indicam que a diversidade da microbiota e, sobretudo, a sua funcionalidade metabólica emergem como fatores determinantes para a saúde, podendo exercer efeitos benéficos ou prejudiciais, a depender do estado fisiológico e das condições do hospedeiro (BAKKEREN et al., 2025, VAN HUL et al., 2024).

Visão geral do eixo microbiota-intestino-cérebro

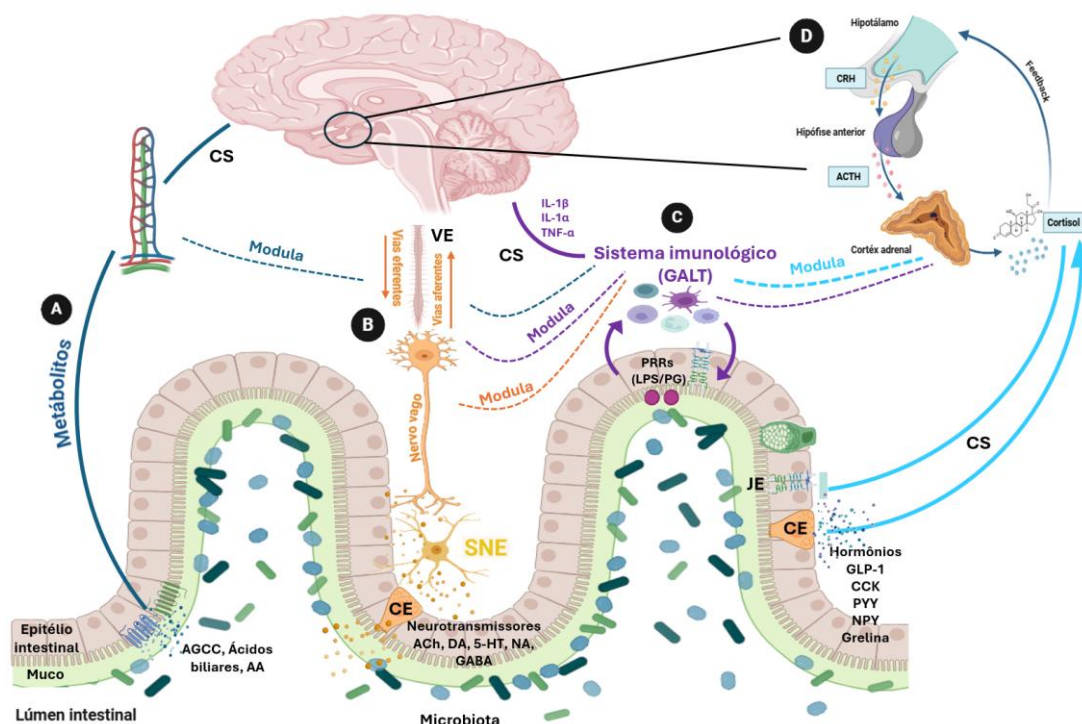


Figura 1. Visão geral do eixo microbiota-intestino-cérebro. A comunicação bidirecional desse eixo ocorre pela integração de vias metabólicas, neurais, imunológicas e endócrinas. (A) Metabólitos podem ser produzidos ou modificados pela microbiota e se ligarem a receptores específicos no EP ou serem absorvidos para circulação sanguínea e atingir tecidos-álvos como o cérebro, influenciar a sinalização neural por meio da ativação de CE e neurônios entéricos, bem como interar com células imunes (pontilhado azul). (B) O nervo vago, o SNE e as vias espinais fornecem rotas rápidas de comunicação neural, enquanto os neurotransmissores ou seus precursores podem ser produzidos ou metabolizados por microorganismos. Além disso, o nervo vago pode modular o SI (pontilhado laranja). (C) Os microorganismos podem integrar com as células imunes, com efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios subsequentes, modulando o eixo HPA e o SNE (pontilhado roxo). (D) A interação da microbiota com CE resulta na liberação de hormônios que atuam localmente, modulando as funções intestinais, ou em tecidos-alvo, como o cérebro, por meio da circulação sanguínea. O Cortisol decorrente do eixo HPA atinge os tecidos alvos pela circulação sanguínea, modula o sistema imunológico e impacta a composição da microbiota intestinal e permeabilidade (pontilhado azul). ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; Ach: Acetilcolina; AGCC, ácidos graxos de cadeia curta; CCK, colecistocinina; CE, célula enteroendócrina; CRH, hormônio liberador de corticotropina; CS, Circulação sistêmica; DA, Dopamina; GALT, tecido linfóide associado ao intestino; GABA, ácido γ -aminobutírico; GLP-1, peptídeo semelhante ao glucagon 1; 5-HT, Serotonina; HPA, eixo hipotálamo-hipófise-adrenal; IL-1 β , interleucina 1 β ; IL-6, interleucina 6; LPS, lipopolissacarídeo; PRRs: receptores de reconhecimento de padrões; PG, peptídeooglicano; PYY, peptídeo YY; NPY, neuropeptídeo Y; NA: noradrenalina; JE, junções estreitas; TNF- α , fator de necrose tumoral- α ; VE, vias espinais. Figura criada com BioRender.com. Adaptado de KUIJER; STEENBERGEN, 2023.

Dentre as funções metabólicas da microbiota intestinal, destacam-se a produção de metabólitos bioativos, como os AGCC, síntese de vitaminas (K e complexo B) e metabolização de aminoácidos (PRAKASH et al., 2011). Esses metabólitos são capazes de modular a síntese e a liberação de neurotransmissores (FUJISAKA; WATANABE; TOBE, 2023), atuando por meio de receptores expressos

em neurônios do sistema nervoso entérico (SNE) e em células enteroendócrinas, regulando motilidade intestinal e excitabilidade neural local, sendo parte desses sinais captados pelo nervo vago (vias aferentes) (VICENTINI et al., 2021) podendo também influenciar o sistema imune e endócrino (Figura 1). O comportamento ansioso impacta significativamente a composição e a funcionalidade da microbiota intestinal, por meio do eixo HPA (CHAUDHRY et al., 2023). A ativação crônica desse eixo compromete a integridade da barreira intestinal ao promover alterações nas proteínas de junção estreita e favorecimento de estado pró-inflamatório sistêmico (JIANG et al., 2024, VALITUTTI et al., 2025) (Figura 1).

A microbiota intestinal não é homogênea ao longo do TI, exibindo variações qualitativas e quantitativas entre os diferentes segmentos intestinais (YANG et al., 2025). Essa heterogeneidade reflete a adaptação microbiana às condições ambientais específicas de cada região (MARTINO, et al. 2022, PRAKASH et al., 2011). O colón representa o segmento com a maior densidade e diversidade microbiana (SIMONSON; SIMONSON; NOBÉCOURT, 2025), no entanto, segmentos do intestino delgado (ID), como duodeno, jejuno e íleo também abrigam comunidades microbianas, embora em menor abundância e complexidade (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2016). Nesses segmentos, a interação de microrganismos e o sistema imunológico é fundamental para a manutenção da homeostase intestinal, especialmente devido à intensa exposição a antígenos luminiais e à presença de estruturas imunológicas especializadas (BROWN; ESTERHÁZY, 2021).

Evidências indicam que o E₂ exerce influência significativa sobre a função da microbiota, afetando a atividade metabólica desses microorganismos (SANTOS-MARCOS, et al., 2023; GHOSH, et al., 2022). Essa interação ocorre, em parte, através da enzima *β-glucuronidase*, produzida por conjunto de bactérias intestinais denominado “estroboloma”, responsáveis pela desconjugação de estrogênios previamente metabolizados no fígado e excretados na bile (BAKER; AL-NAKKASH; HERBST-KRALOVETZ, 2017). Esse processo possibilita a reabsorção intestinal desses hormônios, contribuindo para a manutenção da circulação entero-hepática dos estrogênios (SUI; WU; CHEN, 2021). Esse mecanismo estabelece relação bidirecional, na qual o E₂ influencia a composição da microbiota intestinal e, simultaneamente, a microbiota regula a disponibilidade sistêmica desse hormônio (WANG et al., 2025).

Durante o período reprodutivo, concentrações fisiológicas de E₂ promove o

crescimento de bactérias comensais benéficas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que contribuem para a produção de AGCC, metabólitos que fornecem energia aos enterócitos, reduz pH intestinal e inibe a colonização por patógenos (PARK; KIM; KIM, 2025). A sinalização mediada pelo receptores de E₂ (ER- β) presentes nos enterócitos, regulam vias moleculares essenciais para a manutenção da integridade da barreira intestinal, incluindo a expressão e organização de proteínas de junções estreitas, como ocludina e claudinas (CHAUDHRY et al., 2023). Essas estruturas são fundamentais para o controle da permeabilidade paracelular e para a prevenção da translocação de microrganismos e de seus produtos, como lipopolissacarídeos (LPS) (ODENWALD; TURNER, 2017). Em condições fisiológicas, o E₂ favorece a manutenção dessa barreira ao aumentar a expressão dessas proteínas e estimular a produção de muco, limitando a adesão bacteriana e a entrada de componentes pró-inflamatórios na circulação sanguínea (CHAUDHARY et al., 2023; VAN HUL et al., 2024).

No entanto, durante a senescência reprodutiva feminina, ocorre reorganização sistêmica desses mecanismos fisiológicos. Evidências indicam que, após a menopausa, há a diminuição acentuada da diversidade microbiana resulta em perfil semelhante ao observado em indivíduos do sexo masculino (PETERS et al., 2022). Contudo, essas modificações se iniciam durante a transição da perimenopausa, caracterizando-se pela redução na abundância de bactérias benéficas e aumento de microorganismos potencialmente prejudiciais, como *Enterobacter* e *Proteobacteria*, resultando em quadro de disbiose (XIE et al., 2024; CHEN; LI; OU-YANG, 2022). O aumento de bactérias patogênicas, favorece liberação e translocação de LPS, moléculas capaz de ativar receptores do tipo Toll, como o TLR-4, promovendo inflamação intestinal e contribuindo para estado inflamatório sistêmico de baixo grau central na indução da inflamação intestinal (DI VINCENZO et al., 2024).

O sistema imunológico (SI) é uma das principais vias de comunicação entre o TGI e o SNC (O'RIORDAN et al., 2025). A constante exposição à microbiota impõe desafios significativos ao SI, exigindo a integração de múltiplas camadas de defesa, incluindo a camada mucosa, barreira física constituída pelo epitélio intestinal, PRRs, os quais, em conjunto, coordenam a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas (Figura 2) (OKUMURA; TAKEDA, 2025). O tecido linfóide associado ao intestino (GALT, do inglês *Gut-Associated Lymphoid Tissue*) é constituído por conjunto de estruturas e células imunológicas, incluindo placas de Peyer, linfonodos

mesentéricos, além de tecido difuso presente na lâmina própria e no epitélio, desempenhando papel central na manutenção do equilíbrio imunológico intestinal e sistêmico (Figura 2) (WANG; HE; YANG; AI, 2024, BEMARK; PITCHER; DIONISI; SPENCER, 2024).

Nesse contexto, os mastócitos (MCs) localizados na lâmina própria e nos linfonodos mesentéricos emergem como importantes células imunológicas inata efectoras de respostas rápidas, capazes de integrar sinais locais proveniente da microbiota e da barreira epitelial para coordenar respostas imunes adaptativas especializadas (DILEEPAN et al., 2023, PAL et al., 2020). Evidências relatam que os MCs possuem receptores de E_2 ($ER\alpha$ e $ER\beta$), o que os torna particularmente sensíveis as alterações hormonais (WANG et al., 2025). Nesse contexto, alterações nas concentrações estrogênicas característica do período da perimenopausa, podem favorecer a ativação e a desgranulação dessas células, resultando na liberação de mediadores inflamatórios como histamina, triptase e citocinas, os quais podem aumentar a permeabilidade intestinal e amplificar a resposta inflamatória local e sistêmica (THEOHARIDES, 2023, McCALLION et al., 2022; ALBERT-BAYO et al., 2019). Além disso, mastócitos estabelecem comunicação funcional com terminações nervosas entéricas, modulando reflexos neurais e contribuindo para a sinalização ao longo do eixo intestino–cérebro (CONTI et al., 2018), modulando a intensidade de comportamentos ansiogênicos, influenciando mecanismos neurais quanto ativação microglial, além de prejuízos cognitivos (TRAINA, 2019). Além do mais, a desgranulação de MCs eleva o estresse oxidativo sistêmico pela produção de ERO perpetuando a neuroinflamação (KEMPURAJ et al., 2019).

Esses achados evidenciam que o eixo microbiota-intestino-cérebro emerge como sistema integrador central na compreensão das alterações observadas durante a perimenopausa, nas quais flutuações hormonais típicas desse período contribuem para modificações imunológicas e neurobiológicas relevantes. No entanto, as evidências acerca de intervenções dietéticas nessa população ainda são limitadas.

Composição do sistema imunológico intestinal

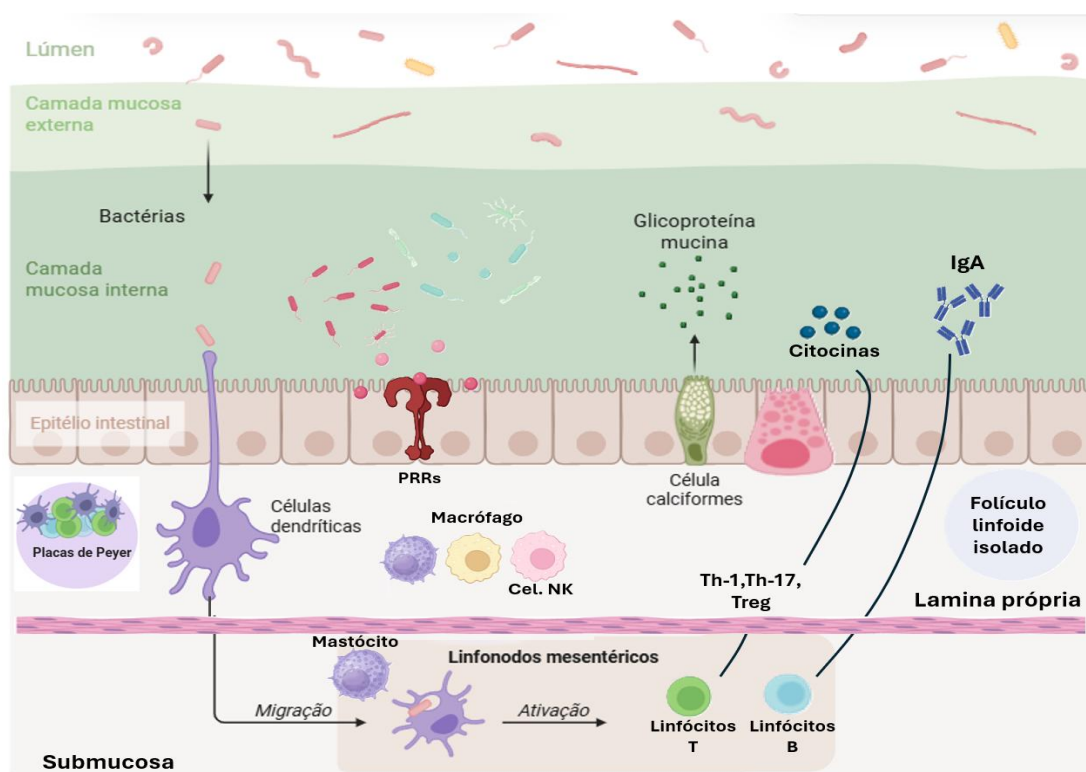


Figura 2. Composição do sistema imunológico intestinal. O sistema imunológico é composto pela camada de muco (externa e interna), epitélio intestinal, lâmina própria, camada muscular da mucosa, submucosa e camada muscular externa. No lúmen intestinal, as bactérias estão presentes e entram em contato com a camada mucosa externa, seguida pela camada mucosa interna, protegida pelo epitélio intestinal. As células dendríticas reconhecem os lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos através dos receptores TLR-4 e TLR-2, ativando a resposta imune local. As células calciformes secretam mucina, uma glicoproteína que ajuda a formar uma barreira protetora. Na lâmina própria, macrófagos, células NK e mastócitos contribuem para a resposta imune inata, enquanto linfócitos T (Th1, Th17 e Treg) e linfócitos B são ativados nos linfonodos mesentéricos, promovendo a produção de citocinas e anticorpos IgA. Este processo integra a defesa mucosa e a manutenção da homeostase intestinal, sendo fundamental para a imunidade adaptativa local e sistêmica. Folículos linfoides isolados atuam como centros de vigilância imunológica na mucosa intestinal. Feito com biorender.com. Adaptado de WANG; HE; YANG; AI, et al., 2024.

Atualmente, os probióticos tem sido amplamente utilizados como abordagem terapêutica para o tratamento da disbiose (CARÍAS DOMÍNGUEZ et al., 2025). O termo “probiótico”, se origina do latim (“pro”, que significa “para”) e do grego (“bios”, que significa “vida”), compreende como “para a vida” (HAMILTON-MILLER; GIBSON; BRUCK, 2003). Definidos como microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro, os probióticos tem sido usado há décadas para melhorar a saúde do TGI (FAO/WHO, 2002). Entre os principais mecanismos de ação desses microorganismos destacam-se a colonização e restauração de comunidades microbianas perturbadas, a exclusão

competitiva de patógenos, estimulação da produção de AGCC, além da secreção de mucinas (PLAZA-DÍAZ et al., 2019). O probiótico *VSL#3* é formulação de alta concentração com cepas múltiplas, relatada como mais eficientes do que espécies únicas devido a mecanismos sinérgicos (GIONCHETTI et al., 2005). Seus efeitos terapêuticos foram documentados em diversas doenças sistêmicas, incluindo doenças gastrointestinais, obesidade, diabetes, doenças alérgicas, osteopatias, além de distúrbios no SNC (CHENG et al., 2020).

Autores tem relatado o uso de psicobióticos, probióticos que conferem benefícios à saúde mental, através da modulação de vias como o eixo HPA, e ao sistema imune através da produção de citocina e síntese de metabólitos neuroativos (KIMSE et al., 2024). Tais vias também desempenham papel central na patogênese de doenças inflamatórias intestinais (DII), conexões amplamente exploradas na literatura (ROSS, 2023; QIAN et al., 2025). Estudos pré-clínicos com ratos Wistar machos jovens (3 meses) e idosos (22 meses) tratados com *VSL#3*, observou-se modulação de funções neuronais e melhora no LTP, associadas à regulação de genes cerebrais envolvidos em processos inflamatórios e plasticidade neuronal (DISTRUTTI et al., 2014).

A suplementação probiótica modula a atividade cerebral em repouso e a conectividade funcional, reduzindo o recrutamento de diversas áreas cerebrais, especialmente durante o processo de emoções negativas (HUTCHINSON et al., 2026). No entanto, estudos que avaliaram o uso de probiótico em diferentes faixas etárias observaram que os efeitos da intervenção sobre a cognição não são uniformes e parecem depender da idade quanto do estado do hospedeiro (GUO et al., 2026). No contexto menopausa e pós-menopausa, o uso de probiótico tem se mostrado benéfico para a saúde óssea (BOSE; SHARAN, 2024) e alterações ginecológicas (BARREA et al., 2023). Ademais, a administração probiótica tem sido consistentemente associada à atenuação do estresse oxidativo e do desequilíbrio redox, mecanismos centrais do envelhecimento (MEHRABADI, SADR, 2020). Dessa forma, postulamos como hipótese central que a suplementação probiótica representa intervenção não invasiva durante a perimenopausa, capaz de promover benefícios cognitivos e comportamentais e por meio da modulação do estado redox e das vias imunológicas no eixo intestino-microbiota-cérebro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos da suplementação sobre parâmetros neurocomportamentais, oxidativos e celulares relacionados à resposta imune intestinal em ratas adultas e no período do envelhecimento reprodutivo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar análise histomorfométrica do intestino delgado em ratas adultas e senis após suplementação probiótica com VSL#3 ou NaCl.
- Avaliar a quantidade e morfologia de mastócitos (MCs) no mesentério de ratas em período cíclico e na periestrofpausa antes e após suplementação probiótica com VSL#3.
- Avaliar sistema antioxidante no hipocampo e plasma após suplementação com probiótico VSL#3 em ratas cíclicas e na periestrofpausa.
- Avaliar o comportamento e a deambulação das ratas em período cíclico e na periestrofpausa antes e após suplementação probiótica com VSL#3.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba (FOA/UNESP) (processo nº 1028-2023) e conduzido de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal para garantir que o sofrimento e o número de animais fossem reduzidos ao mínimo. Os animais foram mantidos em ambiente controlado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; ciclo de luz 12/12 h invertido; umidade $55\% \pm 10\%$) com acesso à água e ração *ad libitum* (Neovia Nutrição e Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP – Brasil). O ciclo estral foi verificado pela análise do esfregaço vaginal antes e após intervenções (NaCl ou probiótico), analisado a fresco ao microscópio óptico no período de duas semanas consecutivas (NICOLA et al., 2016; FERREIRA et al., 2015).

3.2 Grupos experimentais

Após a confirmação da preservação da função reprodutiva em ratas adultas cíclicas e da presença de diestro persistente nas ratas senis, quarenta e seis ratas Wistar foram distribuídas aleatoriamente entre dois grupos experimentais: grupo salina (NaCl) e grupo probiótico (VSL#3). Duas ratas senis foram perdidas durante o experimento por morte de causa não identificada. Importante registrar que somente participaram deste estudo as ratas adultas com ciclo estral regular e ratas senis com ciclo estral irregular, em diestro persistente. As intervenções foram realizadas via gavagem diária por 42 dias consecutivos. Os animais foram randomicamente distribuídos nos seguintes grupos experimentais: ratas cíclicas designadas ao grupo salina ou probiótico (08Me/NaCl; 08Me/VSL#3); e ratas senis na periostropausa designadas ao grupo salina ou probiótico (23Me/NaCl; 23Me/VSL#3) (Figura 3).

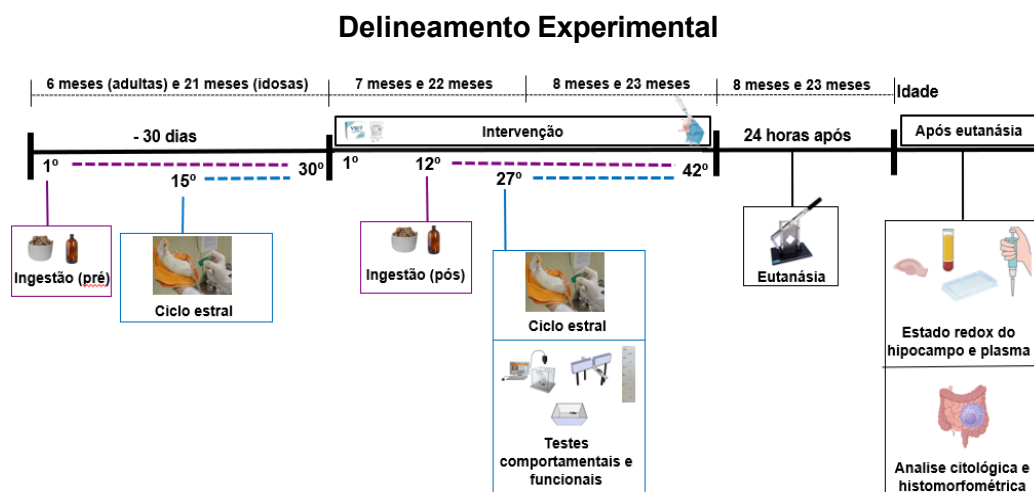


Figura 3. Esquema do desenho experimental. Inicialmente, o consumo de água e ração de ratas Wistar (06 meses; 21 meses) foi mensurado 30 dias antes do início da intervenção (linha tracejada roxa). Os animais foram submetidos à análise citológica vaginal 15 dias antes do início do tratamento (linha tracejada azul). Após a confirmação do ciclo estral, os animais foram submetidos a suplementação com VSL#3 ou NaCl, por gavagem, durante 42 dias, distribuída nos seguintes grupos: 08Me/NaCl; 08Me/VSL#3 e 23Me/NaCl; 23Me/VSL#3. Durante o período experimental, o consumo de água e ração foi mensurado (linha tracejada roxa). Quinze dias antes da eutanásia dos animais, a coleta do ciclo estral e os testes comportamentais e funcionais foram realizados (linha tracejada azul). Vinte e quatro horas após a última intervenção, a eutanásia foi realizada por decapitação para coletar material biológico para análises bioquímicas, citológicas e histomorfométricas.

3.3 Intervenção

As ratas com 07 meses e 22 meses, receberam salina (NaCl: 0,1 mL/kg/dia) ou probiótico (VSL#3: 10^9 bilhões de UFC/kg/dia; diluído para 0,1 mL/kg/dia/solução salina) durante 42 dias, conforme descrito por DISTRUTTI et al. (2014). O probiótico VSL#3® é composto por oito cepas bacterianas: três do gênero de *Bifidobacterium*

(espécies *B. breve*, *B. longum**, *B. infantis**); quatro do gênero de *Lactobacillus* (espécies *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei* e *L. delbrueckii* subespécie *bulgaricus***) e uma da espécie *Streptococcus thermophilus*. * Atualmente reclassificado como *B. lactis*; ** Reclassificado como *L. helveticus*. Cada sachê contém 450 bilhões de unidades formadoras de colônia (UFC) e foram armazenados sob refrigeração a 2-8 °C, conforme as instruções do fabricante. Todos os animais foram pesados diariamente para o ajuste individual da dose. A administração foi realizada via gavagem oral, utilizando seringas de 1,0 mL e realizando a higienização da cânula entre cada animal com álcool 70%, além da lavagem com soro fisiológico para remoção de resíduos.

3.4 Ingestão alimentar e ingestão hídrica

O consumo de ração e água foi mensurado em nível de gaiola, com três animais alojados por gaiola. Para cada gaiola, foram fornecidos semanalmente 800 g de ração e 1000 mL de água. Após sete dias, as quantidades remanescentes de ração e água foram medidas, e o consumo foi calculado pela diferença entre as quantidades inicialmente fornecidas e as quantidades residuais. Como as medidas foram obtidas por gaiola, e não por animal individual, a gaiola foi considerada a unidade experimental para a análise estatística. O consumo médio de ração e água foi calculado com base em 36 animais, igualmente distribuídos entre os grupos NaCl e VSL#3 (n = 3 gaiolas/grupo; 3 animais/gaiola), tanto para as ratas adultas quanto para as ratas senis, durante quatro semanas.

3.5 Coleta e armazenamento de amostras de amostras de tecido

3.5.1 Eutanásia por decapitação

Os animais foram eutanasiados por decapitação no período da manhã (das 8h00 às 11h00 – ciclo escuro), a fim de minimizar os efeitos do ritmo circadiano. O sangue foi coletado em tubos contendo heparina, centrifugado, e o plasma foi aliquoteado e armazenado a -80°C para análise posterior do estado redox. Os encéfalos foram rapidamente removidos e mantidos por aproximadamente 1 minuto sobre uma superfície metálica resfriada com gelo, a fim de evitar a degradação de proteínas. Em seguida, os encéfalos foram seccionados no plano sagital e os hipocâmpos foram dissecados, imersos em tampão fosfato (50 mmol/L; pH 7,4) para

remoção do excesso de sangue superficial, sendo ambos os hemisférios armazenados a -80°C para posterior análise do estado redox.

3.5.2 Coloração por Hematoxilina e Eosina (HE)

Após a eutanásia, o intestino delgado foi removido e segmentados em duodeno, jejuno e íleo, conforme protocolo adaptado de RODRIGUES et al. (2022). Esses segmentos foram submetidos à análise histomorfométrica. Para isso, foram obtidas secções histológicas com espessura de 5 µm em micrótomo, as quais foram posteriormente estendidas em banho-maria a 36 °C para adequada expansão dos cortes. Em seguida, as secções foram submetidas à coloração por hematoxilina e eosina (HE). Inicialmente, realizou-se a desparafinização em estufa a 56–58 °C por 30 minutos, seguida de desparafinização completa em xilol. Posteriormente, procedeu-se à hidratação em série decrescente de etanol e lavagem em água corrente. As lâminas foram então coradas com hematoxilina por 2 minutos, seguidas de lavagem em água e coloração com eosina por 7 minutos. Após essa etapa, realizou-se nova lavagem em água, seguida de desidratação em série crescente de etanol, diafanização em xilol e montagem das lâminas com meio apropriado e lamínulas de vidro. As lâminas histológicas foram digitalizadas utilizando o scanner digital de lâminas *Motic EasyScan One*. A morfologia da mucosa intestinal foi avaliada por meio de metodologia adaptada de SEGÚ et al. (2022). Foram analisados os seguintes parâmetros: (1) altura das vilosidades, definida como a distância entre a junção vilosidade/cripta e o ápice da vilosidade; (2) profundidade das criptas, correspondente à invaginação entre vilosidades adjacentes; e (3) relação vilosidade/cripta. As mensurações foram realizadas utilizando o software *ImageJ*, sendo expressas em micrômetros (µm). As análises foram conduzidas nos três segmentos do intestino delgado de ambos os grupos experimentais.

3.5.3 Análise de mastócitos no mesentério intestinal

O intestino removido foi transferido para uma placa de Petri contendo PBS (0,02 M) para evitar o ressecamento do tecido. Em seguida, o mesentério foi cuidadosamente distendido e a membrana mesentérica foi removida. Após a coleta, o tecido foi transferido para um frasco contendo formalina tamponada a 10% e mantido em fixação por 48 horas. Após esse período, as amostras foram lavadas em água

corrente por, no mínimo, 1 hora, para remoção do excesso de formalina. Posteriormente, o tecido foi disposto sobre uma lâmina histológica e corado com azul de toluidina a 1% (em água destilada). Em seguida, realizou-se a montagem das lâminas com lamínula utilizando meio de montagem apropriado. A avaliação celular foi realizada utilizando um microscópio Olympus BX53. Para a análise quantitativa, a contagem de mastócitos foi realizada sob objetiva de 20×, em 10 campos microscópicos por amostra, sendo os resultados expressos como média. A análise morfológica foi realizada sob objetiva de 100×, também em 10 campos microscópicos, por avaliação manual, com foco na identificação de mastócitos íntegros e degranulados, com o objetivo de identificar possíveis respostas inflamatórias locais e avaliar os efeitos da intervenção.

3.5.5 Análise do estado redox do hipocampo e do plasma

3.5.5.1 Preparação do homogenato de tecido hipocampal

No dia da análise bioquímica, os hipocampus isolados foram descongelados em gelo e lavados em solução salina gelada (NaCl 0,9%, m/v). O homogeneizador Potter-Elvehjem (modelo MA 099; Marconi, Piracicaba, SP/Brasil) foi utilizado para preparar homogenatos dos hipocampus 10% em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,4) contendo 0,2% (v/v) de Triton X 100, ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) 10 mmol/L e fluoreto de fenilmetanossulfonilo 2 mmol/L (PMSF). Os homogenatos foram centrifugados (Eppendorf R 5810; Eppendorf, Hamburgo/Alemanha) a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquotado e armazenado a -80°C por menos de 2 semanas até as análises de estado redox: proteína total (PT), proteína carbonilada (PC), espécies reativas de ácido tiobarbitúrico (TBARs), capacidade antioxidante total não enzimática (TAC) por redução de ferro, capacidade oxidante total não enzimática (TOC) por redução de ferro, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx). Os sobrenadantes utilizados para a determinação total de glutational reduzida (GSH) foram preparados em 5% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA) contendo 2 mmol/L de ácido dietilenotriaminopentaacético (EDTA), centrifugados a 4.000 rpm por 10 min a 4°C. Para determinar o teor de proteína, utilizou-se uma amostra de albumina sérica bovina (BSA) (1mg/mL) como padrão (HARTREE, 1972; LOWRY et al., 1951), onde as absorbâncias foram lidas a 660nm

e os resultados expressos em $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.5.5.2 Determinação do dano oxidativo proteico e lipídico no hipocampo e no plasma

A concentração de PC foi quantificada (450 nm) pelo método alcalino 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (MESQUITA et al., 2014). O conteúdo de carbonil foi calculado, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{450} = 22.308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da concentração de TBARs (532 nm) (BUEGE; AUST, 1978). A quantidade de aldeídos formados foi calculada pelo coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.5.5.3 Determinação da defesa antioxidante não-enzimática no hipocampo e no plasma

A TAC foi determinada espectrofotometricamente (593 nm) por meio da capacidade de redução férrica do plasma, conforme descrito anteriormente por BENZIE et al. (1996). Os resultados foram calculados utilizando curva padrão com diferentes concentrações de soluções de FeSO_4 . A concentração de GSH foi medida usando 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) de acordo com o método espectrofotométrico descrito por BEUTLER et al. (1963). A quantidade de GSH foi determinada pelo coeficiente de extinção molar conhecido de GSH ($1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ao contrário, no hipocampo, os sobrenadantes de plasma utilizados para a determinação do GSH total foram preparados em 10% (w/v) de TCA contendo 2 mmol/L de EDTA. Em seguida, a mistura foi agitada em vórtex e a absorbância foi medida a 412 nm para detectar o conteúdo de GSH. Os níveis de GSH foram expressos por grama de proteína total.

3.5.5.4 Determinação da defesa antioxidante enzimática no hipocampo e no plasma

A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente (420 nm) mensurando a taxa de inibição da autooxidação do pirogalol em 50 mmol/L de tampão Tris-HCl (pH 8,2), contendo 1 mmol/L de ácido dietilenotriamina pentacético (DTPA). Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir a taxa de autooxidação do pirogalol em 50% (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente (240 nm)

medindo a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,0) (AEBI, 1984). As unidades da atividade da enzima foram determinadas usando o coeficiente de extinção molar de H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade da CAT foram definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 mmol de H_2O_2 por 1 minuto.

A atividade da GPx foi determinada pelo método que utiliza o peróxido de di-terc-butila como substrato da reação, ocorrendo oxidação da GSH pela GPx gerando GSSG, que é convertido em GSH pela glutathione redutase (GR), consumindo nessa reação uma molécula de NADPH (WENDEL, 1981). A atividade da enzima foi determinada espectrofotometricamente monitorando o consumo de NADPH a 340 nm em meio contendo 50 mmol/L de tampão fosfato de sódio (pH 7,5), 1 mmol/L de EDTA, 0,1 mmol/L de NADPH, 0,4 mmol/L de azida sódica, 0,1 U/mL de GR, 1 mmol/L de GSH, 0,5 mmol/L de peróxido de terc-butila e amostras. A azida sódica foi usada para bloquear a atividade da catalase. A diminuição linear da taxa de GPx foi definida como 1 mmol de NADPH consumido por minuto, usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.6 Testes cognitivos e funcional

Os testes foram realizados com as ratas adultas e ratas senis ao final (08 meses e 23 meses) do período experimental. Todos os testes foram realizados no período da manhã, na fase escura do ciclo de luz invertido, momento em que os animais apresentam maior atividade motora. Os testes ocorreram em sala acusticamente isolada, com controle de temperatura e umidade controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$), iluminada por lâmpadas light emitting diode (LED) vermelha, com intensidade inferior a 1 LUX. Após cada teste realizado, os aparatos foram higienizados com solução de etanol a 5% para a remoção dos sinais olfativos para o próximo animal. A sequência dos testes foi padronizada, seguindo sempre a mesma ordem: labirinto em cruz, campo aberto, reconhecimento de objetos e deambulação. As filmagens foram realizadas com câmeras instaladas sobre os aparatos, possibilitando captura total das imagens e registro dos animais nos diferentes testes realizados. Cada aparato foi limpo com solução de etanol após cada teste realizado com o animal. Os resultados de campo aberto, labirinto em cruz elevado e reconhecimento de objetos foram analisados pelo software EthoWatcher® (CRISPIM-JUNIOR et al., 2012). O conjunto

de dados, exceto teste de deambulação, foi analisado utilizando o software EthoWatcher® (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brasil). O resultado do teste de deambulação foi mensurado com auxílio de paquímetro.

3.6.1 Teste de Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevada é modelo amplamente utilizado para avaliação do comportamento ansioso em roedores, baseando-se em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente aversivos (RODGERS; DALVI, 1997; MONTGOMERY, 1955). O teste foi realizado no aparato construído em MDF revestido com fórmica preta, composto por quatro braços de dimensões iguais (50 cm x 10 cm), organizados em forma de cruz, tendo como base plataforma central quadrada (10 cm x 10 cm), elevada a 50 cm do solo. Dois dos braços opostos são abertos (sem proteção lateral), enquanto os outros dois são fechados por paredes laterais de MDF com 40 cm de altura. Os braços partem do quadrado central (10 cm x 10 cm) e são elevados à 50 cm acima do chão. Cada animal foi gentilmente colocado no quadrado central podendo explorar livremente o labirinto por 5 min, sendo os comportamentos registrados as variáveis temporais (tempo de permanência nos braços abertos (BA), nos braços fechados (BF) e a frequência de entradas nos BA) e as variáveis etológicas (frequência de exploração vertical, autolimpeza e imersão da cabeça, que ocorre quando o animal está no BA, com a cabeça posicionada fora e abaixo do nível do BA).

3.6.2 Teste de campo aberto

As atividades locomotora e exploratória dos animais foram avaliadas pelo teste de campo aberto, realizado em condições semelhantes às do ambiente de habitação no biotério (FRYE; PETRALIA; RHODES, 2000; CRUSIO, SCHWEGLER, ABELEN, 1989). O aparato é composto por caixa de MDF revestida com fórmica preta, cercada por paredes laterais de 40 cm de altura, com fórmica preta, cercada por paredes pretas (40 cm), com base de 100 cm x 100 cm. A superfície foi subdividida por linhas brancas em 25 quadrados de 20 cm x 20 cm. Cada animal foi individualmente colocado no centro da arena, permanecendo em livre exploração por 5 minutos. Durante esse período, foram registradas as análises comportamentais que caracterizam as variáveis temporais: tempo gasto na periferia (região adjacente às paredes), tempo na região central (áreas afastadas das paredes), frequência de entrada na região central,

e o índice de tigmotaxia, que representa a tendência do animal a se locomover próximo às bordas da arena (calculado como a porcentagem de tempo gastos nos quadrantes periféricos em relação ao tempo total do teste); e as variáveis etológicas: frequência de exploração vertical (comportamento em que o animal se apoia apenas nas patas traseiras e se ergue para investigar o ambiente) e de autolimpeza (comportamento de higienização corporal utilizando língua, dentes e/ou patas dianteiras).

3.6.3 Teste de reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi utilizado para avaliar a retenção da memória de trabalho de curto (MCP) e longo prazo (MLP) (FURINI et al., 2020; ANTUNES; BIALA, 2012), após a administração de NaCl ou suplementação com probiótico. O protocolo experimental compreendeu três sessões de ambientação, seguidas de três sessões de teste. As gravações foram realizadas com câmeras posicionadas acima dos aparatos, permitindo o registro completo dos comportamentos dos animais durante as diferentes etapas. Após cada teste realizado com o animal, os aparatos foram higienizados com solução de etanol a 5%.

Para a ambientação, os animais foram expostos a arena (caixa de polipropileno) sem a presença de objetos, em sessões de 15 minutos cada, com intervalo de 24 horas entre as sessões. Vinte e quatro horas após a última sessão de ambientação, os animais foram expostos novamente à arena para a sessão de treino, na qual dois objetos idênticos foram inseridos na arena (ficando A + A), permitindo a livre exploração por 15 minutos. Para o teste em geral, os objetos utilizados foram de tamanho adequado, inodoros, com diferentes cores e textura, e não móveis. Os objetos utilizados neste estudo foram duas tampas de tubo de falcon amarelo (objetos A); um mini copo de alumínio rosa (objeto B); e um mini pote de porcelana branca (objeto C), todos fixados com fita adesiva e dispostos paralelamente entre si de acordo com seu uso. Três horas após o treino, foi realizado o teste 1, destinado à avaliação da memória de curto prazo. Nessa fase, um dos objetos A foi substituído pelo objeto B (ficando A + B), e os animais puderam explorar os dois objetos por 5 minutos. Após 24h após o treino, os animais foram expostos a arena para o teste 2, correspondente a memória de longo prazo, que consistiu da substituição do objeto B, por um novo objeto C (ficando A + C), permitindo-se então a exploração dos objetos A e C por 5

minutos. Todas as sessões foram filmadas para análise posterior. O desempenho dos animais foi avaliado por meio do índice de reconhecimento, calculado com base no tempo de exploração dos objetos A, B e C em relação ao tempo total de exploração dos objetos durante os testes. O tempo de exploração foi definido como os períodos em que as ratas farejavam ou tocavam o objeto novo com o focinho. Os momentos em que os animais apenas corriam ao redor, sentavam-se sobre os objetos ou os escalavam não foram considerados como comportamento de exploração.

3.6.4 Teste de deambulação

O teste de marcha fornece informações sobre medidas do comprimento de passada e largura da base, fornecendo informações sobre a marcha do animal e reflete o estado funcional (BYTYÇI; HENEIN, 2021), também foi mensurado o tempo total em que cada animal levou para percorrer o aparato. Neste teste, cada animal foi posicionado no início do aparato que consiste em caixa retangular de MDF (45 cm de comprimento, 8 cm de largura e 20 cm de altura; sem teto e forrada com papel branco) onde caminharam por três tentativas no período de habituação. Em seguida, suas patas traseiras foram colocadas em contato com tinta preta atóxica (guache) e as patas dianteiras com tinta marrom (mesmas especificações), onde novamente caminharam pelo aparelho, agora marcando suas pegadas. Posteriormente, foram mensurados a largura e o comprimento da passada com auxílio de paquímetro. O tempo foi registrado em segundos para cada animal.

3.7 Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A normalidade foi avaliada pelo teste de D'Agostino–Pearson para variáveis dos testes funcionais, cognitivos e análises citológicas, e pelo teste de Shapiro–Wilk para variáveis bioquímicas e ingestão alimentar e hídrica. As análises do peso corporal, ovários e útero foram realizadas pelo teste *t* de *Student*. As comparações entre grupos foram realizadas por ANOVA de duas vias, considerando os fatores intervenção (NaCl vs. VSL#3) e idade (8 vs. 23 meses), seguida do *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas. O tamanho de efeito foi estimado pela análise do η^2 parcial (η^2_p , *partial eta squared*). O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises

foram realizadas no *GraphPad Prism* (versão 10; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros Gerais

A análise do esfregaço vaginal de ratas Wistar cíclicas e senis na periostropausa está apresentado na figura 4. A avaliação do ciclo estral das ratas cíclicas aos 6 meses de idade (antes das intervenções) e aos 8 meses (após VSL#3 ou NaCl) revelou a ocorrência de todas as fases do ciclo, indicando manutenção da ciclicidade e preservação da função reprodutiva. Ao final do período das intervenções, não foram verificadas alterações nas fases do ciclo estral entre as ratas adultas dos grupos experimentais (Fig. 4). A análise do ciclo estral de ratas senis, evidenciou predominância em diestro em comparação as outras fases, tanto antes (21 meses) como ao final do período (23 meses) das intervenções, indicando diestro persistente (Fig. 4). Essa irregularidade no ciclo estral foi caracterizada pelo aumento na duração das fases do ciclo estral e recorrência da citologia vaginal leucocitária em 3 ou 4 ciclos consecutivos, indicando o período da periostropausa. Esses resultados confirmaram o perfil reprodutivo irregular característico das ratas senis incluídas neste estudo.

Incidência das fases do ciclo estral

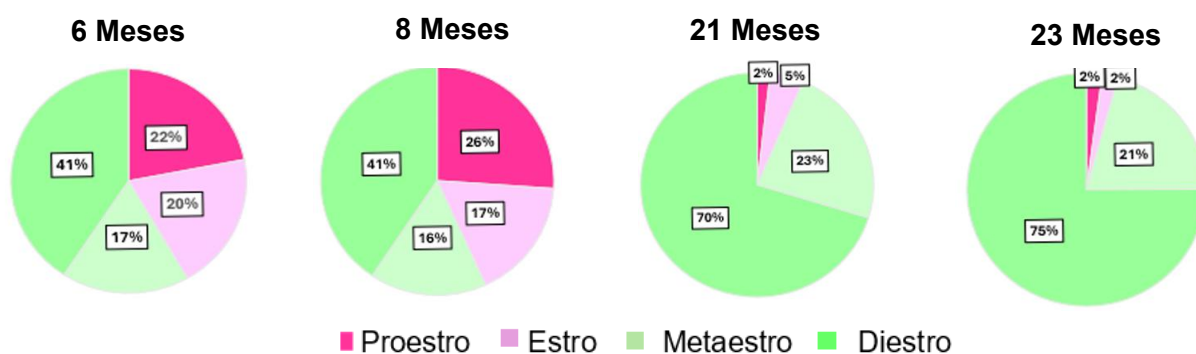


Figura 4. Incidência das fases do ciclo estral. Ratas adultas (6 e 8 meses) e Ratas senis (21 e 23 meses) antes e ao final do período das intervenções com NaCl ou VSL#3. O ciclo estral apresentou as fases: Proestro; Estro; Metaestro e Diestro. As coletas citológicas foram realizadas durante 15 dias antes do início da intervenção e durante 15 dias ao final do período experimental.

A análise do peso corporal dos animais antes e ao final do período das intervenções (Tabela 1), não revelou diferenças significantes entre os grupos avaliados aos 6 e 8 meses de idade. Da mesma forma, nos animais de 21 e 23 meses,

não foram identificadas diferenças estatisticamente significantes entre os valores do peso corporal inicial e ao final do período das intervenções.

Peso corporal das ratas Wistar adultas e senis

Grupos	Peso corporal (g)			
	6Me	8Me	21Me	23Me
NaCl	340.4 ± 12.011	333.5 ± 12.650	385.8 ± 18.570	375.4 ± 15.03
VSL#3	344.0 ± 9.489	340.0 ± 9.805	388.2 ± 12.420	372.2 ± 14.780

Tabela 1. Peso corporal inicial (06 meses; 21 meses) e ao final do período das intervenções (08 meses; 23 meses) das ratas Wistar inseridas no estudo. As comparações entre os mesmos animais em diferentes idades (06Me e 08 Me; 21Me e 23Me) foram realizadas com teste *t* pareado. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de *Shapiro-Wilk*. Os valores são expressos como média ± EPM. Abreviaturas e símbolos: NaCl = solução salina; VSL#3 = probiótico; Número de animais/grupo: 22.

Ao analisar o peso do útero e dos ovários de ratas adultas Wistar (08 meses) e ratas senis (23 meses) após as intervenções (NaCl ou VSL#3), foi evidenciado que não há diferença estatística entre os grupos (Tabela 2).

Peso de úteros e ovários das ratas Wistar adultas e senis

Grupos	Peso (g)			
	Útero		Ovários	
	8Me	23Me	8Me	23Me
NaCl	0.594 ± 0.05	0.562 ± 0.04	0.135 ± 0.01	0.162 ± 0.02
VSL#3	0.649 ± 0.03	0.675 ± 0.05	0.149 ± 0.01	0.203 ± 0.03

Tabela 2. Pesos de úteros e ovários das ratas Wistar com 08 e 23 meses de idade após administração de NaCl ou VSL#3. As comparações entre animais de diferentes idades (8 meses vs. 23 meses) foram realizadas utilizando o teste *t* não pareado. A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de *Shapiro-Wilk*. Os resultados são expressos como média ± EPM. Abreviaturas e símbolos: NaCl = solução salina; VSL#3 = probiótico; Número de animais/grupo: 22.

4.2 Ingestão alimentar e hídrica

O consumo de ração e água em ratas adultas e senescentes após a administração de NaCl ou suplementação com VSL#3 (aos 8 e 23 meses de idade) está apresentado na Figura 5. A análise de variância (ANOVA) de duas vias para o consumo de ração revelou efeito principal significativo da idade (Fig. 5A; $F_{(3,32)} = 11,54$; $p < 0,0001$), com tamanho de efeito elevado ($\eta^2_p = 0,520$). Também foram observados tamanhos de efeito moderados para a semana ($\eta^2_p = 0,141$) e para a interação idade × semana ($\eta^2_p = 0,152$). A análise *post hoc* revelou diferenças

significantes entre os grupos 08Me/NaCl e 23Me/NaCl durante a primeira ($p = 0,0149$), segunda ($p = 0,0361$) e quarta semanas ($p = 0,0302$). Entretanto, não foram observadas diferenças significantes no consumo de água entre os grupos experimentais (Fig. 5B).

Consumo alimentar e hídrico das ratas Wistar adultas e senis

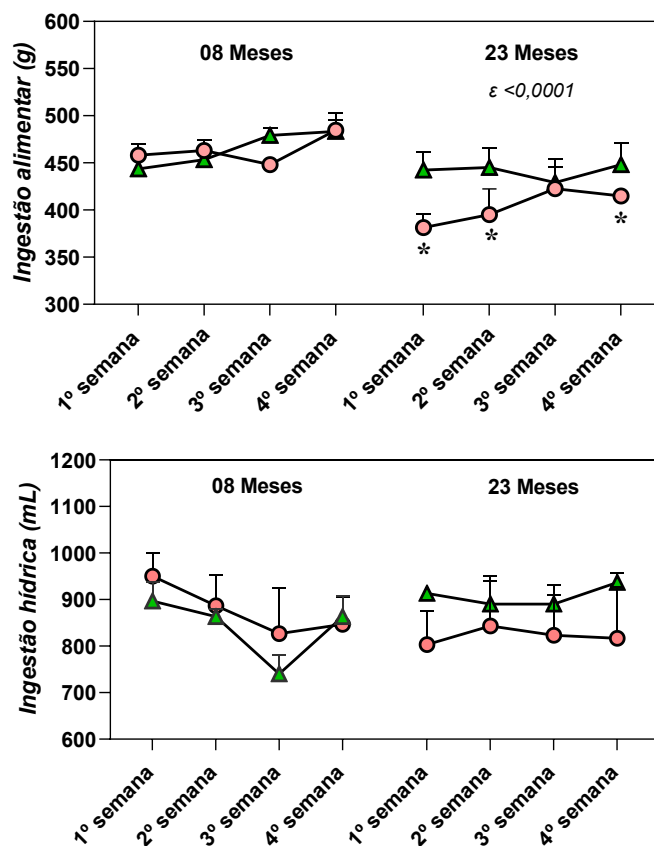


Figura 5. Consumo de ração (A) e água (B) em ratas Wistar adultas (8 meses de idade) e senescentes (23 meses de idade) após 42 dias de administração de NaCl (●) ou suplementação com VSL#3 (▲). Os dados representam o consumo médio de ração e água mensurado ao longo de quatro semanas durante a fase final do protocolo experimental. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). O consumo de ração e água foi mensurado em nível de gaiola, sendo a gaiola considerada a unidade experimental para as análises estatísticas ($n = 3$ gaiolas/grupo; 3 animais/gaiola). ANOVA de duas vias: (ϵ) idade. Teste post hoc de Tukey: * $p = 0,004$ vs. grupo 08Mo/NaCl.

4.3 Análise morfométrica do intestinal delgado utilizando coloração por hematoxilina-eosina (HE).

Com o objetivo de avaliar a integridade da mucosa intestinal nos diferentes segmentos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), foi realizada análise histomorfométrica comparativa entre os grupos experimentais após administração de NaCl ou suplementação probiótica (Figuras 6 e 7).

No duodeno, a análise ANOVA de duas vias para a altura das vilosidades (Fig. 6A) não revelou interação significativa entre idade e intervenção ($F_{(1,16)} = 2,897$, $p = 0,1081$), embora o tamanho de efeito da interação tenha sido elevado ($\eta^2_p = 0,153$). Foram observados efeitos principais da idade ($F_{(1,16)} = 419,5$, $p < 0,0001$; $\eta^2_p = 0,963$) e da intervenção ($F_{(1,16)} = 20,77$, $p = 0,0003$; $\eta^2_p = 0,565$). A análise *post hoc* de Tukey mostrou que as ratas do grupo 23Me/NaCl apresentaram redução da altura das vilosidades em comparação as ratas do grupo 8Me/NaCl ($p < 0,0001$). Por outro lado, a suplementação probiótica nas ratas senis promoveu aumento significativo na altura das vilosidades em relação ao grupo que recebeu NaCl ($p = 0,0022$), sugerindo possível efeito restaurador do probiótico. Em contrapartida, mesmo com a suplementação, os animais senis apresentaram menor altura de vilosidades quando comparados as ratas adultas submetidas à mesma intervenção ($p < 0,0001$). A profundidade das criptas no duodeno (Fig. 6B) apresentou interação significativa da idade e intervenção ($F_{(1,16)} = 154,2$, $p < 0,0001$), com elevados tamanhos de efeito para interação ($\eta^2_p = 0,906$), idade ($\eta^2_p = 0,931$) e intervenção ($\eta^2_p = 0,931$). O grupo 23Me/NaCl apresentou aumento da profundidade das criptas em relação ao grupo 8Me/NaCl ($p < 0,0001$), enquanto a suplementação probiótica reduziu significativamente esse parâmetro nas ratas senis ($p < 0,0001$). Na relação vilosidade/cripta do duodeno (Fig. 6C), também foi observada interação significativa ($F_{(1,16)} = 50,40$, $p < 0,0001$), com elevados tamanhos de efeito para idade ($\eta^2_p = 0,972$), intervenção ($\eta^2_p = 0,899$) e interação ($\eta^2_p = 0,759$). As ratas senis apresentaram redução da relação vilosidade/cripta em comparação às adultas ($p < 0,0001$). Entretanto, a suplementação com VSL#3 promoveu aumento significativo desse índice nas ratas senis ($p < 0,0001$) e também nas adultas ($p = 0,0167$), sugerindo melhora da arquitetura intestinal.

No jejuno, a altura das vilosidades (Fig. 6D) apresentou interação significativa entre idade e intervenção ($F_{(1,16)} = 6,275$, $p = 0,0233$), com efeito predominante da idade ($\eta^2_p = 0,945$). As ratas senis apresentaram redução da altura das vilosidades em ambos os tratamentos ($p < 0,0001$), enquanto a suplementação probiótica promoveu recuperação parcial desse parâmetro nas ratas senis em comparação ao grupo 23Me/NaCl ($p = 0,0022$). A profundidade das criptas no jejuno (Fig. 6E) também revelou interação significativa ($F_{(1,16)} = 11,36$, $p = 0,0039$), com elevados tamanhos de efeito para idade ($\eta^2_p = 0,767$), intervenção ($\eta^2_p = 0,242$) e interação ($\eta^2_p = 0,415$). O grupo 23Me/NaCl apresentou aumento da profundidade das criptas em relação às

ratas adultas controle ($p < 0,0001$), enquanto a suplementação probiótica reduziu significativamente esse parâmetro nas ratas senis ($p = 0,0053$). A relação vilosidade/cripta no jejuno (Fig. 6F) apresentou interação significativa dos fatores ($F_{(1,16)} = 10,77$, $p = 0,0047$), com elevado tamanho de efeitos elevado para idade ($\eta^2_p = 0,886$), intervenção ($\eta^2_p = 0,376$) e interação ($\eta^2_p = 0,402$). Houve redução desse índice nas ratas senis dos grupos NaCl ($p < 0,0001$) e VSL#3 ($p = 0,0002$) em comparação às ratas adultas. Entretanto, a suplementação probiótica elevou significativamente a razão vilosidade/cripta nas ratas senis em relação ao grupo controle da mesma idade ($p = 0,0018$).

No íleo, a altura das vilosidades (Fig. 6G) revelou interação significativa da idade e intervenção ($F_{(1,16)} = 8,888$, $p = 0,0087$), com elevado efeito da idade ($\eta^2_p = 0,919$). As ratas senis apresentaram redução da altura das vilosidades em ambos os tratamentos ($p < 0,0001$), enquanto a suplementação com VSL#3 promoveu aumento significativo desse parâmetro em relação às ratas senis tratadas com NaCl ($p = 0,0018$). A profundidade das criptas no íleo (Fig. 6H) apresentou interação significativa ($F_{(1,16)} = 43,28$, $p < 0,0001$), com elevados tamanhos de efeito para idade ($\eta^2_p = 0,918$), intervenção ($\eta^2_p = 0,624$) e interação ($\eta^2_p = 0,730$). As ratas senis apresentaram maior profundidade das criptas em comparação às adultas, independentemente do tratamento ($p < 0,0001$ e $p = 0,0010$). Contudo, a suplementação probiótica reduziu significativamente esse parâmetro nas ratas senis ($p < 0,0001$). Por fim, a relação vilosidade/cripta no íleo (Fig. 6I) também revelou interação significativa da idade e intervenção ($F_{(1,16)} = 38,59$, $p < 0,0001$), com tamanho de efeito extremamente grande para idade ($\eta^2_p = 0,971$), intervenção ($\eta^2_p = 0,640$) e interação ($\eta^2_p = 0,707$). As ratas senis apresentaram redução da relação vilosidade/cripta em comparação às adultas ($p < 0,0001$), enquanto a suplementação com VSL#3 promoveu aumento significativo desse índice nas ratas senis em relação ao grupo NaCl ($p < 0,0001$), indicando melhora parcial da integridade da mucosa intestinal.

Variáveis morfométricas do intestino delgado de ratas Wistar adultas e senis

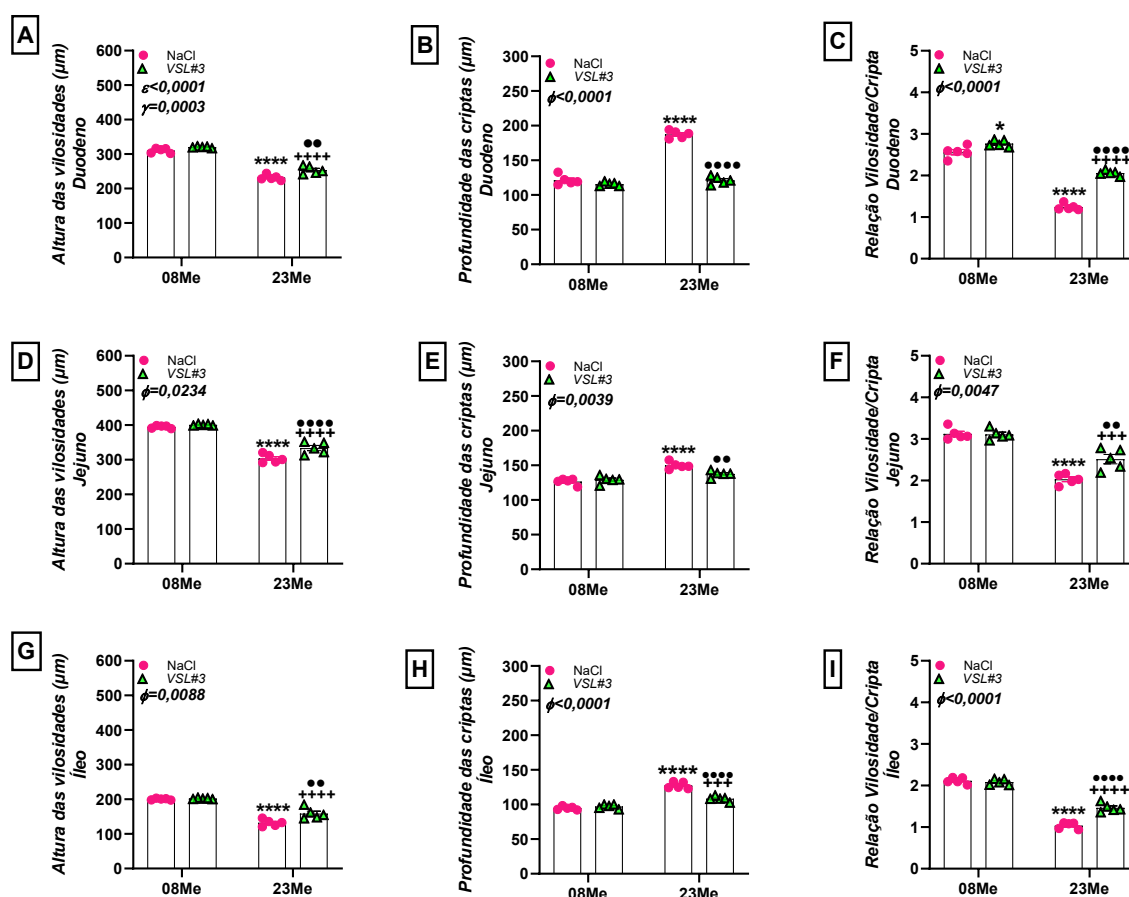


Figura 6. Variáveis morfométricas do intestino delgado de ratas Wistar adultas (08 meses) e senis (23 meses) após administração de NaCl ou VSL#3. (A) Altura das vilosidades do duodeno; (B) profundidade das criptas do duodeno; (C) Relação Vilosidade/Cripta (V/C) do duodeno; (D) Altura das vilosidades do jejuno; (E) profundidade das criptas do jejuno; (F) Relação Vilosidade/Cripta (V/C) do jejuno; (G) Altura das vilosidades do íleo; (H) profundidade das criptas do íleo; (I) Relação Vilosidade/Cripta (V/C) do íleo. Os valores são apresentados como média ± (EPM). ANOVA de duas vias: (Φ) Interação (idade x intervenção); (ε) idade; (γ) intervenção. Teste *post hoc* de Tukey: * p<0,05; ** p=0,0022; *** p<0,0005; **** p<0,0001. * vs. 08Me/NaCl; • vs. 23Me/VSL#3; + vs. 08Me/VSL#3; Número de animais/grupo: 5.

Coloração com hematoxilina e eosina (HE) no intestino delgado de ratas Wistar adultas e senis

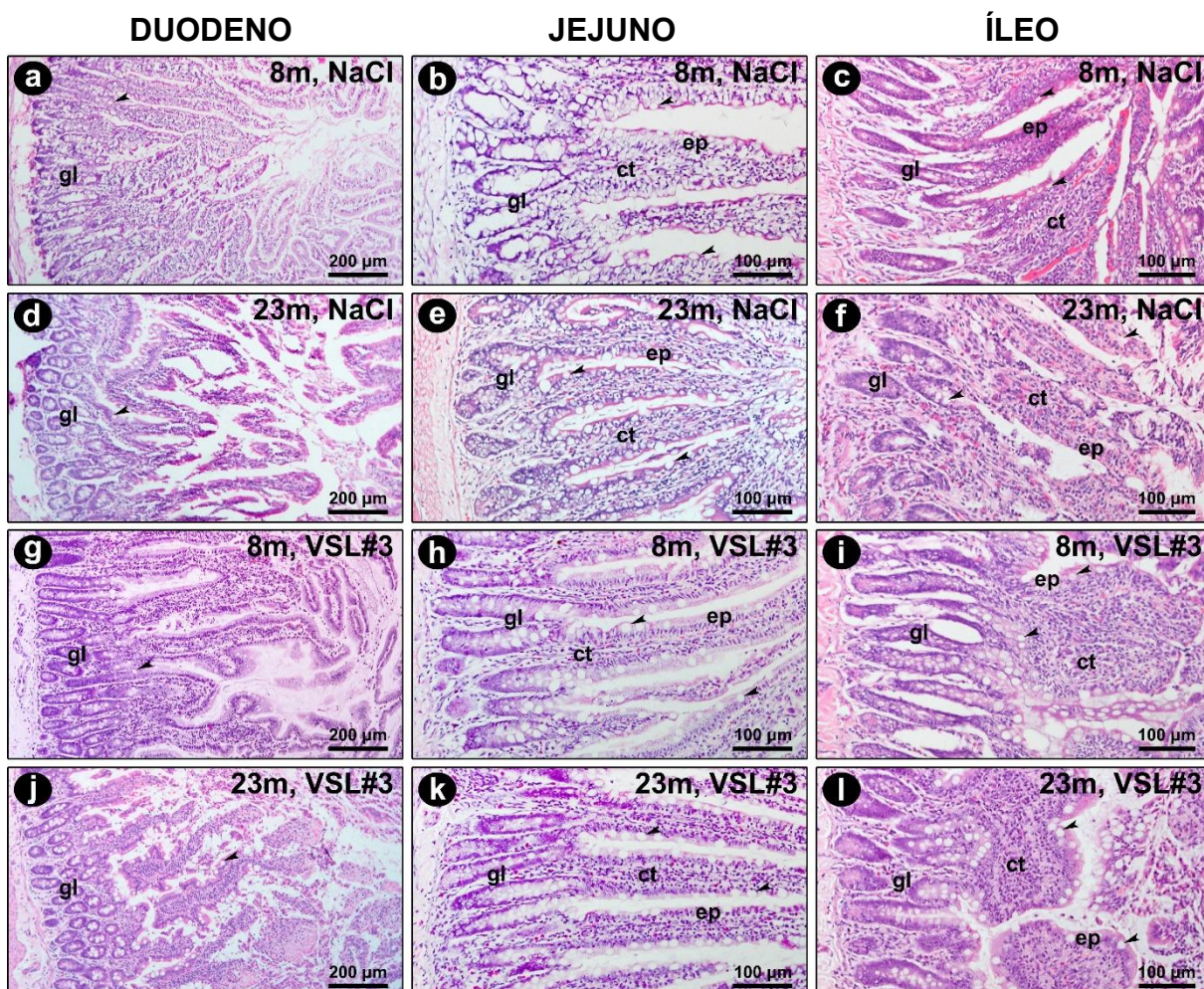


Figura 7. Cortes histológicos representativos do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo), corados por hematoxilina e eosina (HE), de ratas Wistar adultas e senescentes após administração de NaCl ou suplementação com VSL#3. (A) Ratas adultas (8 meses de idade) que receberam solução salina (NaCl). (B) Ratas senis (23 meses de idade) que receberam solução salina (NaCl). (C) Ratas adultas (8 meses de idade) que receberam suplementação com VSL#3. (D) Ratas senis (23 meses de idade) que receberam suplementação com VSL#3. Abreviações: gl: glândulas intestinais; tc: tecido conjuntivo; ep: epitélio intestinal. Setas: células caliciformes. Barras de escala = 100 e 200 µm. Aumento original: 4×.

4.4 Análise citológica dos mastócitos no mesentério intestinal

Os mastócitos no mesentério intestinal foram analisados quantitativa e qualitativamente para avaliar o estado inflamatório intestinal, conforme ilustrado na Figura 8. A análise do número total de mastócitos, por ANOVA de duas vias, revelou efeito principal da idade (Fig. 8A; $F(1, 20) = 54,60$, $p < 0,0001$), com elevada magnitude ($\eta^2_p = 0,486$). A intervenção apresentou efeito pequeno ($\eta^2_p = 0,054$), assim como a interação idade x intervenção ($\eta^2_p = 0,028$). A análise *post hoc* de Tukey demonstrou

redução no número de mastócitos em ratas senis em comparação com ratas adultas, tanto nos grupos tratados com NaCl ($p = 0,0048$) quanto com VSL#3 ($p < 0,0001$).

Após a quantificação dos mastócitos, foi realizada análise morfológica (Fig. 8B-D). Nas ratas adultas (Fig. 8B; 08 meses) observou-se efeito principal da morfologia ($F(1, 36) = 216,3$, $p < 0,0001$), com magnitude muito elevada ($\eta^2_p = 0,857$), enquanto a intervenção ($\eta^2_p = 0,019$) e a interação de morfologia x intervenção ($\eta^2_p = 0,0065$) apresentaram efeitos menores. De forma semelhante, nas ratas senis (Fig. 8C; 23 meses), a morfologia também exerceu efeito predominante ($F(1,32) = 140,8$, $p < 0,0001$; $\eta^2_p = 0,815$), enquanto a intervenção e a interação apresentaram efeitos de magnitude moderada ($\eta^2_p = 0,066$ para ambos). A análise *post hoc* revelou que, independentemente da intervenção, o número de mastócitos em processo de desgranulação foi inferior ao de mastócitos com grânulos citoplasmáticos preservados ($p < 0,0001$).

Ao comparar especificamente os mastócitos desgranulados entre ratas adultas e senis (Fig. 8D), a ANOVA de duas vias revelou efeito principal da intervenção ($F(1, 34) = 9,982$, $p = 0,0033$), com magnitude elevada ($\eta^2_p = 0,227$). O fator idade apresentou efeito de magnitude moderado ($\eta^2_p = 0,067$), enquanto a interação idade x intervenção foi pequena ($\eta^2_p = 0,044$). A análise *post hoc* de Tukey demonstrou que ratas senis tratadas com VSL#3 apresentaram número menor de mastócitos desgranulados em comparação com ratas de mesma idade que receberam NaCl ($p = 0,0224$).

Análise quantitativa e qualitativa de mastócitos no mesentério intestinal de ratas Wistar adultas e senis

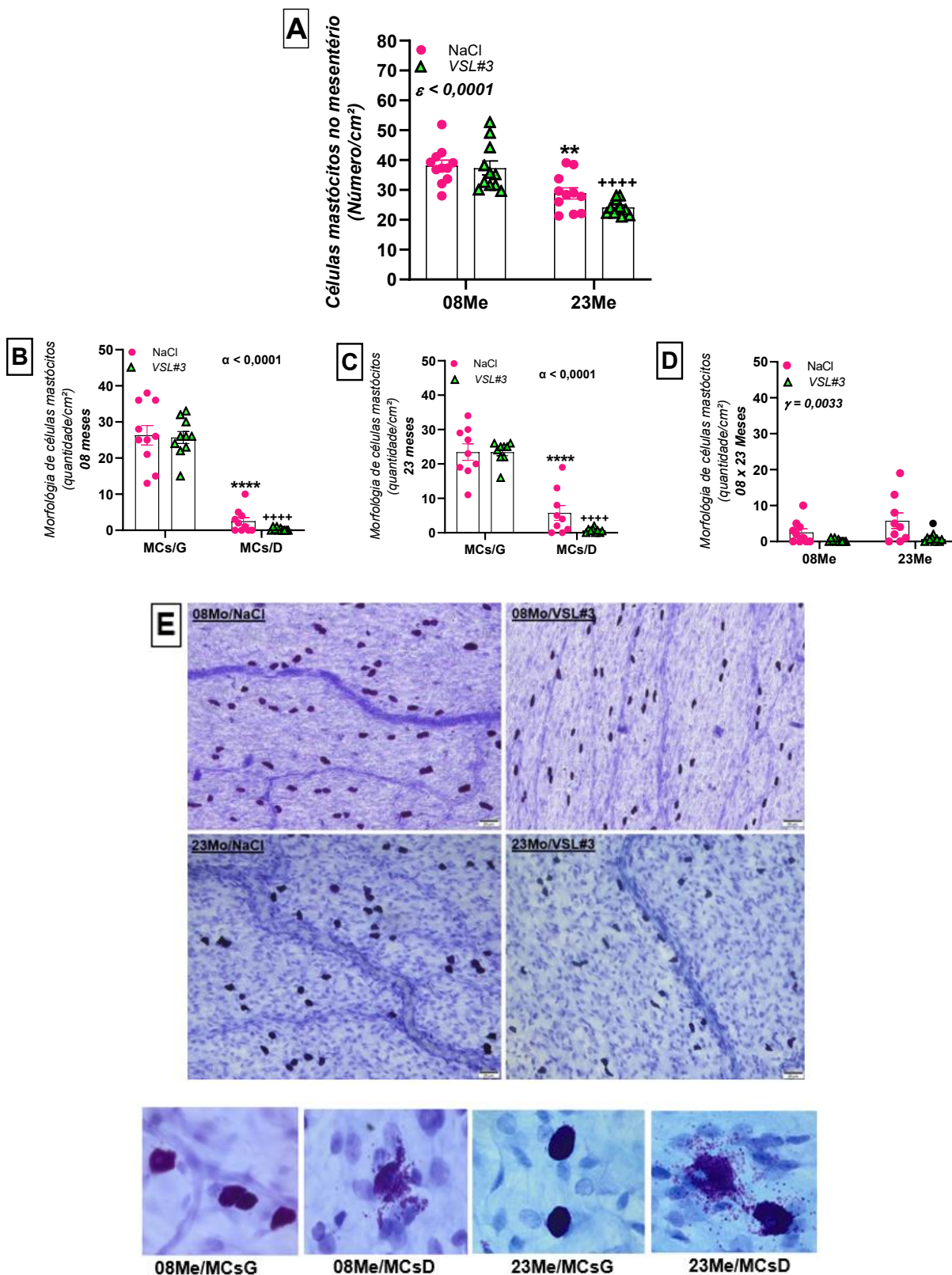


Figura 8. Análise quantitativa e morfológica dos mastócitos no tecido mesentérico de ratas Wistar adultas (8 meses - 8Me) e senis (23 meses - 23Me) após 42 dias de administração de solução salina (NaCl) ou de suplementação com probiótico (VSL#3). (A) Quantidade de mastócitos no mesentério; (B) Morfologia dos mastócitos no mesentério de ratas adultas (8 Me); (C) Morfologia dos mastócitos no mesentério de ratas senis (23 Me), células granuladas (MCsG) e células desgranuladas (MCsD); (D) Morfologia dos mastócitos desgranulados no mesentério de ratas adultas e senis (8 Me vs. 23 Me). Os valores expressos nos gráficos referem-se ao número médio de células observadas em 10 campos por amostra. (E) As imagens registradas utilizando objetiva de 20x e 100x, após coloração com azul de toluidina (1%). Os valores são apresentados como média $\pm$ (EPM). ANOVA de duas vias: (ϵ) idade; (α) morfologia (MCsD vs. MCsG); (γ) intervenção. Teste *post hoc* de Tukey: • $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; ****+*** $p < 0,0001$. (A, D) * vs. 08Me/NaCl; + vs. 08Me/VSL#3; • vs. 23Me/NaCl; (B) * vs. 08 MCsG/NaCl, + vs. 08 MCsG/VSL#3. (C) * vs. 23 MCsG/NaCl, + vs. 23 MCsG/VSL#3. Número de animais/grupo: 10.

4.5 Análises bioquímicas

4.5.1 Estado redox do plasma

Os marcadores redox plasmáticos são apresentados na Figura 9. A análise por ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre idade e intervenção para os níveis de TBARS (Fig. 9A: $F(1, 36) = 43,99$, $p < 0,0001$). Essa análise indicou efeitos muito elevados da idade ($\eta^2_p = 0,975$), da intervenção ($\eta^2_p = 0,622$) e da interação dos fatores ($\eta^2_p = 0,550$). A análise *post hoc* de Tukey demonstrou aumento significativo dos níveis de TBARS nas ratas senis, independentemente da intervenção, em comparação as ratas adultas ($p < 0,0001$). No entanto, as ratas senis suplementadas com VSL#3 apresentaram redução significativa em relação às ratas senis tratadas com NaCl ($p < 0,0001$), sugerindo efeito benéfico do probiótico sobre o dano lipídico sistêmico ($p < 0,0001$). A análise das proteínas carboniladas (Fig. 9B) revelou efeito principal da idade ($F(1, 36) = 11,50$, $p = 0,0017$) com tamanho de efeito grande ($\eta^2_p = 0,242$), enquanto a interação ($\eta^2_p = 0,023$) e a intervenção ($\eta^2_p = 0,008$) apresentaram efeitos pequenos ou desprezíveis, indicando predominância do envelhecimento na oxidação proteica. A análise *post hoc* mostrou redução dos níveis de proteínas carboniladas nas ratas senis tratadas com VSL#3 em comparação às ratas adultas submetidas à mesma intervenção ($p = 0,0021$).

A capacidade antioxidante total (TAC; Fig. 9C) evidenciou a idade como efeito principal ($F(1, 36) = 25,28$, $p < 0,0001$), com grande magnitude ($\eta^2_p = 0,413$), enquanto a intervenção ($\eta^2_p = 0,027$) e a interação ($\eta^2_p = 0,002$) apresentaram efeitos pequenos. *Post test* de Tukey mostrou aumento significativo da TAC nas ratas senis em comparação às ratas adultas, tanto nos grupos com NaCl ($p = 0,0036$) quanto VLS#3 ($p = 0,0089$). Efeito principal da idade também foi verificado na glutathiona reduzida (GSH) plasmática (Fig. 9D: $F(1, 36) = 55,18$, $p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias revelou

grande efeito da idade ($\eta^2_p = 0,605$) sobre os níveis plasmáticos de GSH, além de efeito moderado da interação ($\eta^2_p = 0,090$) e efeito pequeno a moderado da intervenção ($\eta^2_p = 0,050$). A análise do *post test* de Tukey revelou redução significativa dos níveis de GSH nas ratas senis, independentemente da intervenção (NaCl: $p = 0,0021$; VSL#3: $p < 0,001$), em comparação às ratas adultas.

As análises das enzimas antioxidantes são apresentadas nas Figuras 9 E-G. Para a superóxido dismutase (SOD) plasmática (Fig. 9E), observou-se efeito moderado da intervenção ($\eta^2_p = 0,086$), enquanto a idade ($\eta^2_p = 0,040$) e a interação ($\eta^2_p = 0,006$) apresentaram efeitos pequenos.

Observou-se interação significativa entre a idade e intervenção na atividade da catalase (CAT) plasmática (Fig. 9F: $F(1, 36) = 10,82$, $p = 0,0023$). A ANOVA de duas vias revelou efeito grande da interação ($\eta^2_p = 0,231$), sendo o efeito da idade muito elevado ($\eta^2_p = 0,716$) e da intervenção, efeito pequeno ($\eta^2_p = 0,019$). A análise *post hoc* de Tukey revelou menor atividade da CAT nas ratas senis em comparação com às adultas (NaCl: $p = 0,0005$; VSL#3: $p < 0,0001$), sendo essa redução mais acentuada nas ratas senis tratadas com VSL#3 ($p = 0,0300$).

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx; Fig. 9G) apresentou interação significativa ($F(1, 28) = 29,94$, $p < 0,0001$). Esse resultado revelou efeito grande da interação idade $\times$ intervenção ($\eta^2_p = 0,517$), enquanto a idade apresentou efeito moderado a grande ($\eta^2_p = 0,216$) e a intervenção isoladamente apresentou efeito pequeno ($\eta^2_p = 0,001$). A análise *post hoc* de Tukey revelou atividade plasmática de GPx mais elevada nas ratas dos grupos senil/NaCl e adulta/VSL#3, em comparação ao grupo adulta/NaCl ($p = 0,0023$; $p < 0,0001$, respectivamente), enquanto as ratas senis suplementadas com VSL#3 apresentaram menor atividade plasmática da GPx em relação às ratas adultas submetidas à mesma intervenção ($p = 0,0043$).

Marcadores do estado redox plasmático

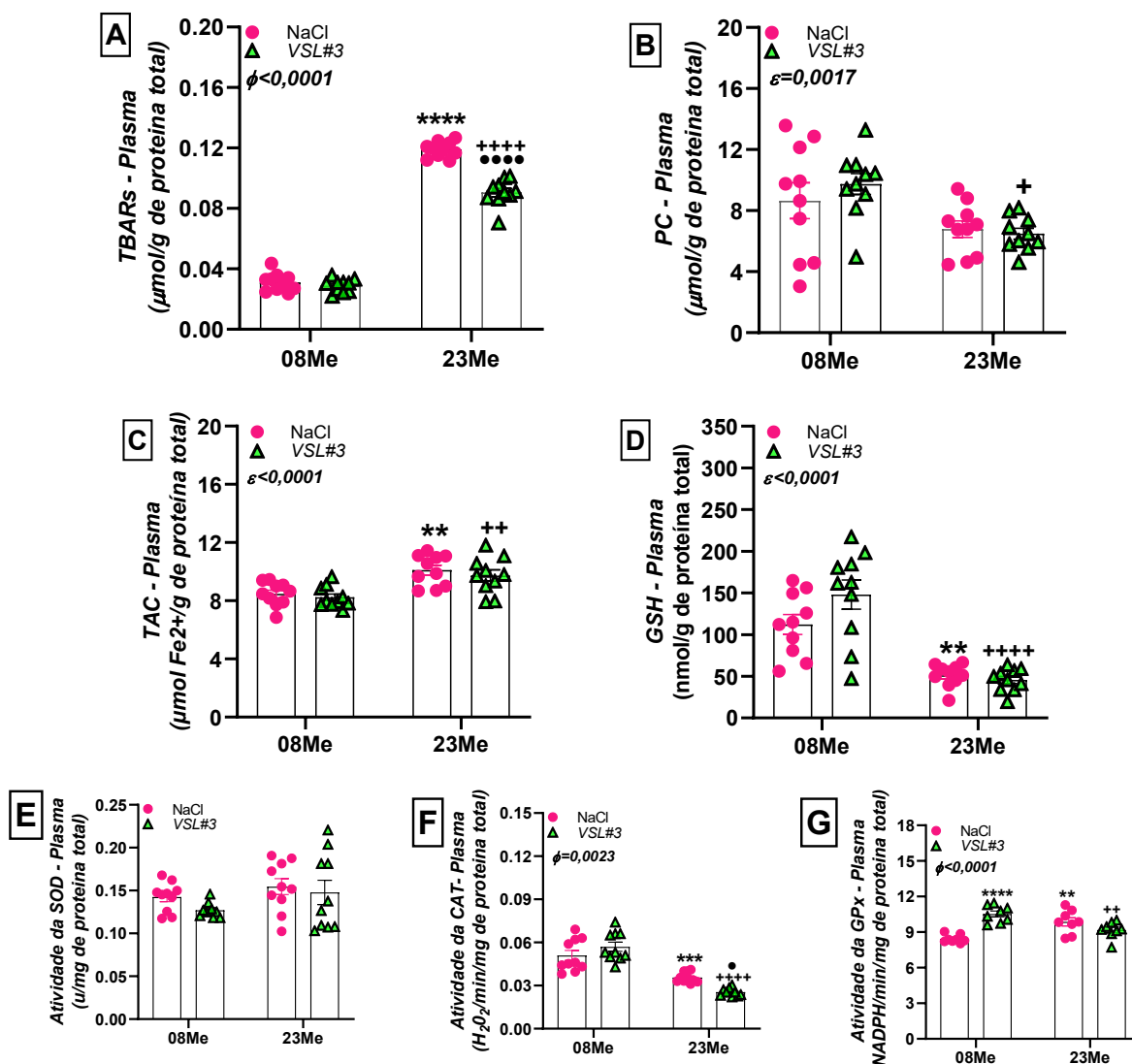


Figura 9. Marcadores do estado redox plasmático em ratos Wistar adultos (08 meses – 08Me) e senis (23 meses – 23Me) após 42 dias de suplementação com solução salina (NaCl) ou probiótico (VSL#3). (A) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS; (B) Proteína Carbonilada – PC; (C) Capacidade antioxidante total (TAC); (D) Glutathiona reduzida (GSH) (E) Atividade da superóxido dismutase (SOD); (F) Atividade da catalase (CAT); (G) Atividade da glutathiona peroxidase (GPx). Os valores são apresentados como média $\pm$ SEM. ANOVA bidirecional: (Φ) Interação (idade x intervenção); (ε) idade. Teste *post hoc* de Tukey: ++ $p < 0,05$; **** $p < 0,005$; *** $p = 0,0001$; ++++++ $p < 0,0001$. * vs. 08Me/NaCl; • vs. 23Me/VSL#3; + vs. 08Me/VSL#3. Número de animais/grupo: 10.

4.5.2 Estado redox do hipocampo

Os marcadores do estado redox no hipocampo estão apresentados na Figura 10. A análise por ANOVA de duas vias revelou efeito principal da idade em todos os desfechos avaliados (Fig. 10A-G), indicando forte influência do envelhecimento sobre a homeostase redox no sistema nervoso central.

Para os níveis de TBARS (Fig. 10A), observou-se efeito principal da idade ($F_{(1, 20)} = 61,98$, $p < 0,0001$), com tamanho de efeito muito elevado ($\eta^2_p = 0,756$),

enquanto a intervenção ($\eta^2_p = 0,044$) apresentou efeito pequeno a moderado e a interação foi desprezível ($\eta^2_p = 0,003$). O *post hoc* de Tukey demonstrou aumento significativo nas ratas senis em comparação às adultas (NaCl: $p = 0,0002$; VLS#3: $p < 0,0001$). A análise das PC (Fig. 10B) também revelou efeito principal da idade ($F (1, 20) = 86,60$, $p < 0,0001$), com efeito muito elevado ($\eta^2_p = 0,812$), enquanto a intervenção apresentou efeito moderado ($\eta^2_p = 0,085$) e a interação efeito pequeno ($\eta^2_p = 0,040$). A análise *post hoc* indicou aumento da concentração de PC nas ratas senis em comparação às ratas adultas, independentemente da intervenção ($p < 0,0001$).

A TAC (Fig. 10C) evidenciou a idade como efeito principal ($F (1, 10) = 596,1$, $p < 0,0001$), com efeito extremamente elevado da idade ($\eta^2_p = 0,949$). Entretanto, a interação apresentou efeito pequeno a moderado ($\eta^2_p = 0,053$) e a intervenção apresentou efeito pequeno sobre TAC total no hipocampo, ($\eta^2_p = 0,015$). *Post test* de Tukey mostrou aumento significativo ($p < 0,0001$) nas ratas senis. Para os níveis de GSH no hipocampo (Fig. 10D), observou-se efeito principal da idade ($F (1, 20) = 104,5$; $p < 0,0001$), com efeito muito elevado da idade ($\eta^2_p = 0,839$), além de efeito grande da interação ($\eta^2_p = 0,169$) e efeito pequeno da intervenção ($\eta^2_p = 0,014$). O *post hoc* de Tukey mostrou diferença estatisticamente significativa entre ratas adultas e senis ($p < 0,0001$).

As análises das enzimas antioxidantes estão apresentadas nas Figuras 10E-G. Para a SOD (Fig. 10E), observou-se efeito principal da idade ($F (1, 20) = 53,06$, $p < 0,0001$), com tamanho de efeito muito elevado ($\eta^2_p = 0,726$), enquanto a interação apresentou efeito moderado ($\eta^2_p = 0,057$) e a intervenção efeito desprezível ($\eta^2_p = 0,005$). As ratas senis apresentaram maior atividade da SOD em comparação às ratas adultas, tanto no grupo VSL#3 ($p = 0,0016$) quanto no grupo NaCl ($p < 0,0001$). A atividade da CAT (Fig. 10F) também apresentou efeito principal da idade ($F (1, 36) = 90,89$, $p < 0,0001$), com efeito extremamente elevado da idade ($\eta^2_p = 0,959$), enquanto a interação apresentou efeito moderado ($\eta^2_p = 0,058$) e a intervenção apresentou efeito desprezível ($\eta^2_p = 0,009$). A análise *post hoc* de Tukey revelou aumento significativo da atividade de CAT nas ratas senis ($p < 0,0001$). A atividade da GPx (Fig. 10G) apresentou efeito principal da idade ($F (1, 20) = 25,44$, $p < 0,0001$), com efeito grande ($\eta^2_p = 0,560$), enquanto a interação ($\eta^2_p = 0,005$) e a intervenção ($\eta^2_p = 0,003$) foram desprezíveis. A análise *post hoc* indicou aumento da atividade de GPx nas ratas senis em comparação às adultas, tanto no grupo VSL#3 ($p = 0,0058$) quanto no grupo NaCl ($p = 0,0157$).

Marcadores do estado redox do hipocampo

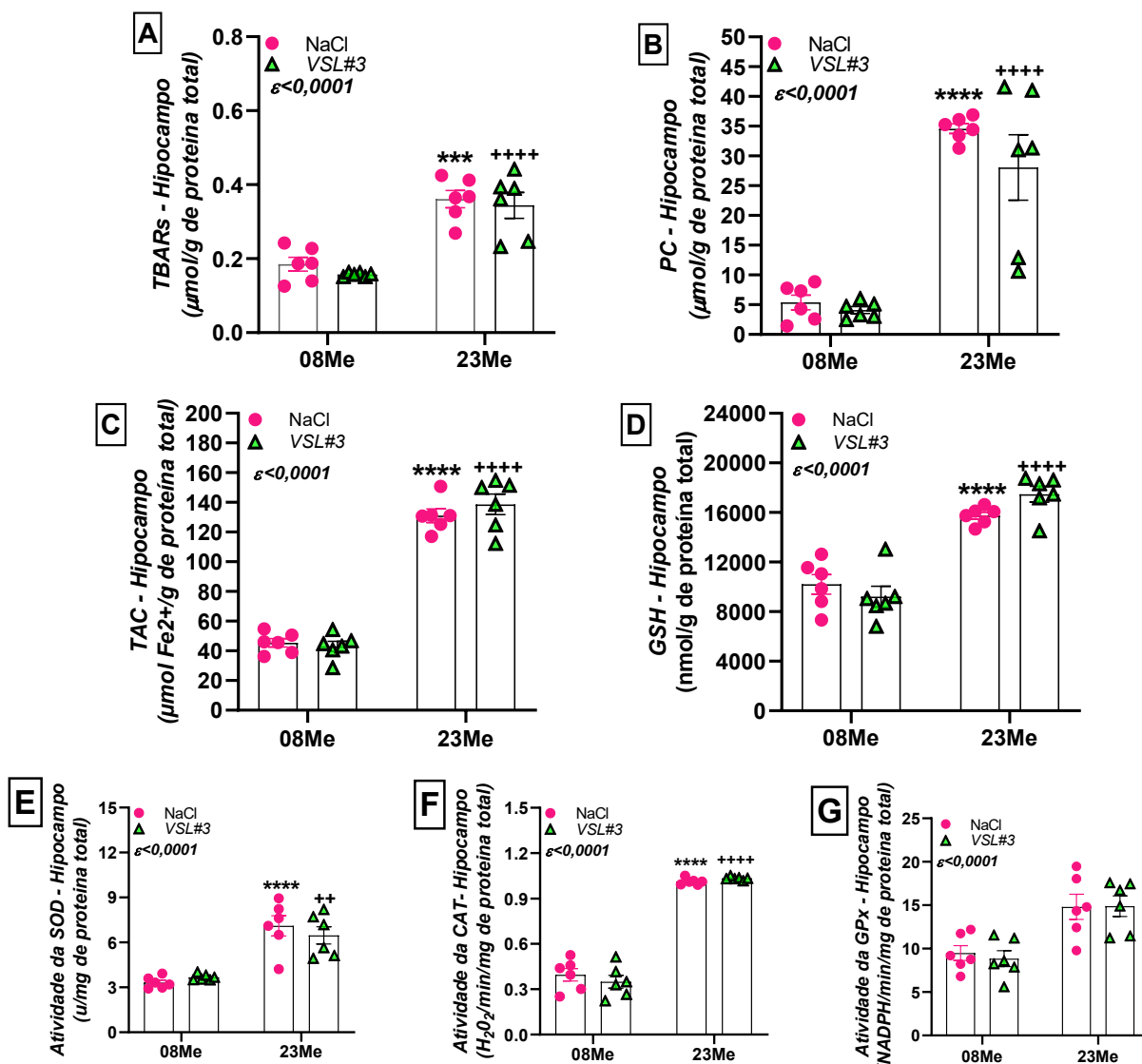


Figura 10. Marcadores do estado redox do hipocampo, analisados em ratos Wistar adultos (08 meses – 08Me) e senis (23 meses – 23Me) após 42 dias com solução salina (NaCl) ou suplementação com probiótico (VSL#3). (A) Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs); (B) Proteína Carbonilada – PC; (C) Capacidade antioxidante total (TAC); (D) Glutathiona reduzida (GSH); (E) Atividade da superóxido dismutase (SOD); (F) Atividade da catalase (CAT); (G) Atividade da glutathiona peroxidase (GPx). Os valores são apresentados como média ± EPM. ANOVA duas vias: (ε) idade. Teste *post hoc* de Tukey: **p*<0,05; *****p*<0,005; ****p*=0,0001; +++++*p*<0,0001. * vs. 08Me/NaCl; • vs. 23Me/VSL#3; + vs. 08Me/VSL#3. Número de animais/grupo: 6.

4.6 Análise comportamental

4.6.1 Labirinto em Cruz Elevado

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) foi utilizado para avaliar o comportamento de ansiedade dos animais, bem como investigar o potencial efeito ansiolítico das intervenções. A análise temporal está apresentada na Figura 11.

A análise do tempo nos braços abertos do aparato revelou efeito principal da intervenção (Fig. 11A: $F(1, 36) = 32,42$; $p < 0,0001$). A ANOVA de duas vias (idade $\times$ intervenção) indicou que a intervenção exerceu efeito de grande magnitude sobre o desfecho ($\eta^2_p = 0,474$), enquanto a interação apresentou efeito moderado ($\eta^2_p = 0,070$) e a idade isoladamente apresentou efeito pequeno ($\eta^2_p = 0,036$). A análise *post hoc* de Tukey demonstrou que as ratas adultas e senis suplementadas com o probiótico VSL#3 permaneceram mais tempo nos braços abertos ($p = 0,0366$ e $p < 0,0001$, respectivamente). Esses resultados indicam a intervenção como principal fator associado às alterações observadas, com contribuição adicional da interação dos fatores.

A análise do tempo de permanência nos braços fechados revelou interação significativa (Fig. 11B: $F(1, 36) = 5,689$; $p = 0,0225$), com efeito moderado ($\eta^2_p = 0,136$). A intervenção também apresentou efeito moderado ($\eta^2_p = 0,091$), enquanto a idade apresentou efeito desprezível ($\eta^2_p = 0,003$). O teste *post hoc* de Tukey revelou que as ratas adultas que receberam a suplementação com probiótico apresentaram redução significativa no tempo de permanência nos braços fechados em comparação com o grupo que recebeu NaCl ($p = 0,0225$), efeito não observado nas ratas senis.

Os dados da frequência de entrada nos braços abertos evidenciaram efeito significativo da intervenção (Fig. 11C: $F(1, 36) = 19,42$; $p < 0,0001$), com grande magnitude ($\eta^2_p = 0,350$). O fator idade apresentou efeito pequeno ($\eta^2_p = 0,020$), enquanto a interação da idade $\times$ intervenção foi desprezível ($\eta^2_p = 0,0004$), indicando ausência de modulação relevante da resposta pela idade. A análise *post hoc* de Tukey demonstrou que as ratas adultas e senis tratadas com VSL#3 apresentaram maior frequência de entrada no centro em comparação com os respectivos grupos que receberam NaCl ($p = 0,0146$ e $p = 0,0221$, respectivamente).

Análise temporal do teste de labirinto em cruz elevado

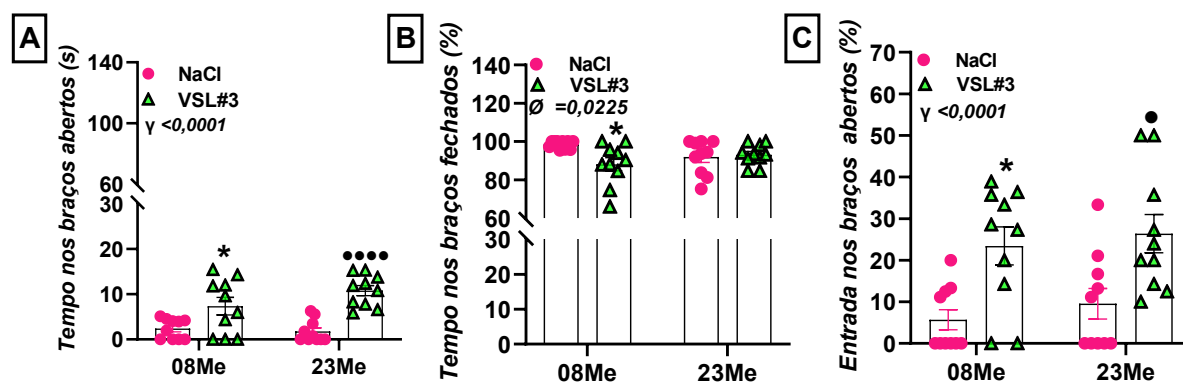


Figura 11. Análise temporal do teste do labirinto em cruz elevado, realizado em ratas Wistar adultas (08 meses) e senis (23 meses) após 42 dias de suplementação com solução salina (NaCl) ou probiótico (VSL#3). (A) Tempo nos braços abertos; (B) Tempo nos braços fechados; (C) Entrada nos braços abertos. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias: (ϕ) Interação idade + intervenção; (γ) intervenção. Teste *post hoc* de Tukey: A: * $p = 0,0336$; $\bullet\bullet\bullet$ $p < 0,0001$; B: * $p = 0,0225$; C: * $p = 0,0146$; $\bullet$ $p = 0,0221$. * vs. 08Me/NaCl; $\bullet$ vs. 23Me/NaCl.

Análise etológica do teste de labirinto em cruz elevado

As análises etológicas do teste de LCE (Fig.12) revelaram efeito principal da intervenção no comportamento de elevação vertical (Fig. 12A: $F(1, 36) = 12,78$, $p = 0,0010$). A ANOVA de duas vias indicou que a intervenção apresentou efeito de grande magnitude ($\eta^2_p = 0,262$), enquanto a interação idade x intervenção apresentou efeito muito pequeno ($\eta^2_p = 0,005$) e a idade isoladamente apresentou efeito desprezível ($\eta^2_p = 0,0005$). A análise do teste de múltiplas comparações de Tukey evidenciou aumento significativo desse comportamento em ratas adultas tratadas com VSL#3 em comparação com as da mesma idade tratadas com NaCl ($p = 0,0353$).

A análise do comportamento de auto-limpeza revelou efeito principal da idade (Fig. 12B: $F(1, 36) = 13,68$, $p = 0,0007$) com grande magnitude ($\eta^2_p = 0,275$). Em contrapartida, a interação idade x intervenção apresentou efeito muito pequeno ($\eta^2_p = 0,005$), enquanto a intervenção isoladamente apresentou efeito desprezível ($\eta^2_p = 0,0004$). A análise *post hoc* de Tukey revelou diferença significativa nas ratas senis que receberam solução de NaCl, apresentando maior frequência do comportamento de auto-limpeza em comparação com os animais adultos tratados com NaCl ($p = 0,0293$).

No comportamento de imersão da cabeça, não foi observada interação significativa entre idade e intervenção (Fig. 12C: $F(1, 36) = 0,8956$, $p = 0,3503$). No entanto, ambos os fatores apresentaram efeitos principais significantes, tanto para a idade ($F(1, 36) = 4,149$; $p = 0,0491$) quanto para a intervenção ($F(1, 36) = 4,546$; $p =$

0,0399). Os dados mostraram que a idade ($\eta^2_p = 0,103$) e a intervenção ($\eta^2_p = 0,112$) apresentaram efeitos de magnitude moderada, enquanto interação apresentou efeito pequeno ($\eta^2_p = 0,024$).

Análise etológica do teste de labirinto em cruz elevado

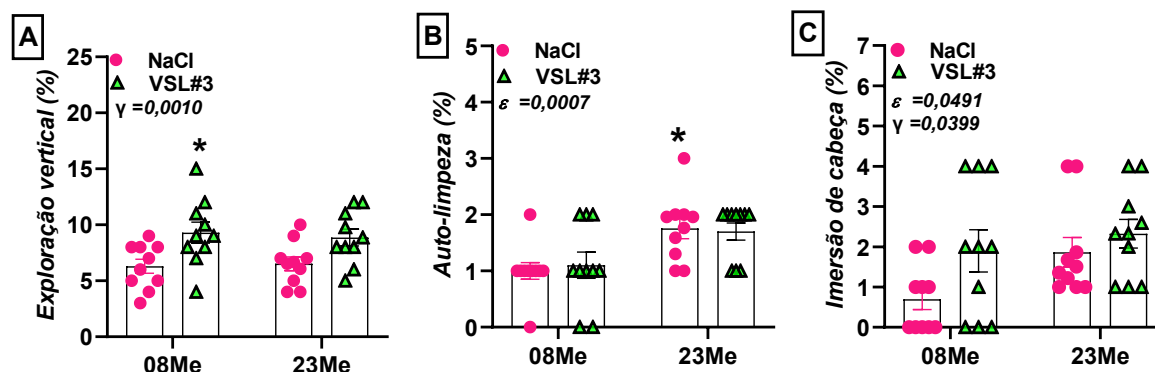


Figura 12. Análise etológica do teste de labirinto em cruz elevado, realizada em ratos Wistar adultos (8 meses de idade – 08Me) e senis (23 meses de idade – 23Me) após 42 dias de suplementação com solução salina (NaCl) ou probiótico (VSL#3). (A) Exploração vertical; (B) Auto-limpeza; (C) Imersão da cabeça. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias: (γ) intervenção; (ϵ) idade. Teste *post hoc* de Tukey: A: $*p = 0,0353$; B: $*p = 0,0293$ vs. 08Me/NaCl.

4.6.2 Campo aberto

A análise temporal da atividade locomotora no campo aberto está apresentada na Figura 13. A ANOVA de duas vias revelou interação significativa entre a idade e a intervenção para o tempo de permanência na periferia (Fig. 13A: $F(1, 36) = 17,65$, $p = 0,0002$). A análise revelou grande efeito da intervenção ($\eta^2_p = 0,439$), da idade ($\eta^2_p = 0,356$) e da interação dos fatores ($\eta^2_p = 0,329$), indicando que a variabilidade observada foi fortemente influenciada tanto pelos efeitos principais quanto pela interação. A análise *post hoc* de Tukey demonstrou que as ratas senis apresentaram menor tempo nos quadrantes periféricos em comparação com as ratas de 8 meses suplementadas com probiótico ($p < 0,0001$), evidenciando efeito dependente da interação idade x intervenção.

Para o tempo de permanência no centro do aparato, também foi observada interação significativa entre os fatores (Fig. 13B; $F(1,36) = 6,356$, $p = 0,0163$). Os tamanhos de efeito indicaram maior contribuição da intervenção ($\eta^2_p = 0,320$) e da interação ($\eta^2_p = 0,150$), enquanto o efeito da idade foi pequeno ($\eta^2_p = 0,030$). O teste *post hoc* de Tukey revelou que as ratas de 23 meses suplementadas com VSL#3 permaneceram tempo maior nos quadrantes centrais em comparação com as ratas da mesma idade que receberam NaCl ($p = 0,0002$).

Além disso, a análise da frequência de entradas na região central do aparato revelou o efeito principal significativo da intervenção (Fig. 13C: $F(1, 36) = 12,53$, $p = 0,0011$). O tamanho do efeito foi elevado para a intervenção ($\eta^2_p = 0,258$), enquanto os efeitos da interação ($\eta^2_p = 0,022$) e da idade ($\eta^2_p = 0,003$) foram pequenos ou desprezíveis. A análise *post hoc* de Tukey demonstrou que as ratas senis suplementadas apresentaram maior frequência de entradas na região central em comparação com o grupo que recebeu NaCl da mesma idade ($p = 0,0167$).

Análise temporal do teste de campo aberto

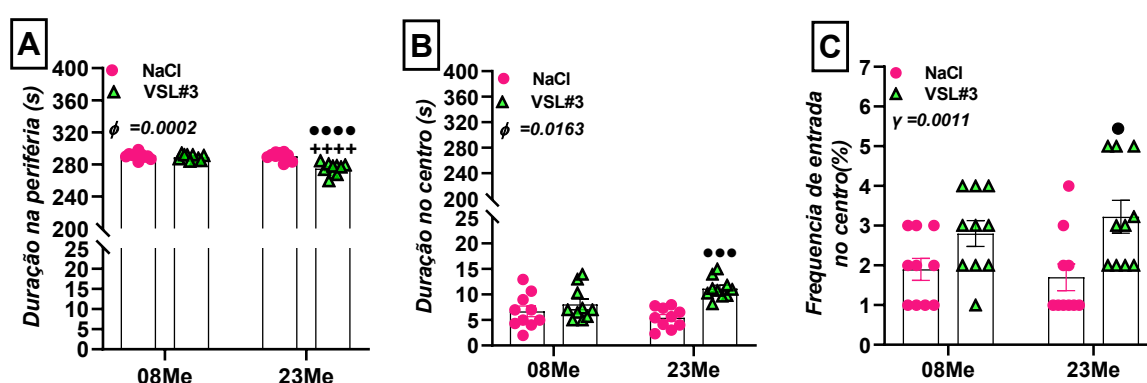


Figura 13. Análise temporal do teste de campo aberto, realizado em ratas Wistar adultas (08 meses – 08Me) e senis (23 meses – 23Me) após 42 dias de suplementação com solução salina (NaCl) ou probiótico (VSL#3). (A) Duração na periferia; (B) Duração no centro; (C) Frequência de entrada no centro. Os valores são apresentados como média ± EPM. ANOVA de duas vias: (Φ) Interação idade + intervenção; (γ) intervenção. Teste *post hoc* de Tukey: +++++••••• $p < 0,0001$; •• $p = 0,0002$; • $p = 0,0167$; + vs. 08Me/VSL#3; • vs. 23Me/NaCl.

A análise etológica do comportamento de exploração vertical (Fig. 14A) revelou efeito significativo da interação idade x intervenção ($F(1, 36) = 19,34$, $p < 0,0001$) com grande magnitude ($\eta^2_p = 0,349$). Entretanto, a idade apresentou efeito pequeno a moderado ($\eta^2_p = 0,053$) e a intervenção apresentou efeito desprezível ($\eta^2_p = 0,003$). A análise *post hoc* de Tukey mostrou redução do comportamento de exploração vertical em ratas adultas suplementadas com VSL#3 ($p = 0,0310$), enquanto ratas senis submetidas à mesma intervenção apresentaram aumento desse comportamento ($p = 0,0106$). Adicionalmente, ratas senis que receberam NaCl apresentaram menor exploração vertical em comparação com às ratas adultas submetidas ao mesmo tratamento ($p = 0,0012$).

A análise do comportamento de auto-limpeza revelou efeito principal da idade (Fig. 14B: $F(1, 36) = 26,67$, $p = 0,0001$), com grande magnitude ($\eta^2_p = 0,426$). A intervenção apresentou efeito pequeno a moderado ($\eta^2_p = 0,052$), enquanto a interação

idade x intervenção foi desprezível ($\eta^2_p = 0,001$). As ratas senis, independentemente da suplementação probiótica, apresentaram maior frequência desse comportamento em comparação às ratas adultas tratadas com VSL#3 ($p = 0,0032$) e com solução de NaCl ($p = 0,0059$).

Análise etológica do teste de campo aberto

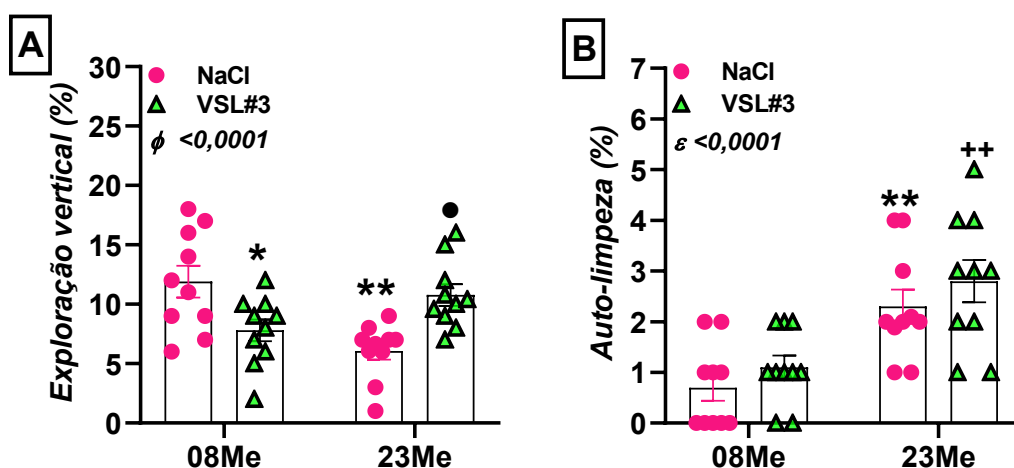


Figura 14. Análise etológica do teste do campo aberto, realizada em ratas Wistar adultas (08 meses – 08Me) e senis (23 meses – 23Me) após 42 dias de suplementação com solução salina (NaCl) ou probiótico (VSL#3). (A) Exploração vertical; (B) Auto-Limpeza. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA de duas vias: (Φ) Interação idade x intervenção; (ϵ) idade. Teste *post hoc* de Tukey: * $p=0,0310$; ** $p<0,005$; ++ $p=0,0059$; • $p=0,0106$. * vs. 08Me/NaCl • vs. 23Me/NaCl; + vs. 08Me/VSL#3.

4.6.3 Teste de reconhecimento de objetos

O tempo total de exploração dos objetos durante a sessão de treino está apresentado na Figura 15A, enquanto os índices de reconhecimento nos Testes 1 e 2 estão apresentados nas Figuras 15B e 15C, respectivamente.

Na sessão de treino (Fig. 15A), foram observados efeitos principais da idade ($F(1,36) = 16,03$, $p = 0,0003$) e da intervenção ($F(1,36) = 13,40$, $p = 0,0008$), ambos com elevada magnitude ($\eta^2_p = 0,308$ e $\eta^2_p = 0,271$, respectivamente), enquanto a interação apresentou efeito menor ($\eta^2_p = 0,004$). A análise *post hoc* indicou que ratas senis suplementadas (23Me/VSL#3) apresentaram maior tempo de exploração em comparação com as ratas da mesma idade que receberam NaCl ($p = 0,0333$). Além disso, ratas senis tratadas com NaCl exploraram os objetos por tempo menor do que ratas adultas sob o mesmo tratamento ($p = 0,0184$).

No Teste 1 (Fig. 15B), a ANOVA de duas vias revelou efeito principal da idade ($F(1,36) = 317,6$, $p < 0,0001$) e da intervenção ($F(1,36) = 4,636$, $p = 0,0381$). Os dados

analisados revelaram que o fator idade exerceu efeito predominante ($\eta^2_p = 0,898$), enquanto a intervenção apresentou efeito moderado ($\eta^2_p = 0,114$). A interação manteve efeito pequeno ($\eta^2_p = 0,080$), sem significância estatística. O teste *post hoc* de Tukey mostrou que ratas adultas tratadas com VSL#3 apresentaram maior tempo de exploração do objeto em comparação com o grupo da mesma idade tratado com NaCl ($p = 0,0419$). No entanto, os ratas senis apresentaram menor tempo de exploração em relação aos grupos de ratas adultas, independentemente da intervenção ($p < 0,0001$).

No Teste 2 (Fig. 15C), a ANOVA de duas vias revelou efeitos principais da idade ($F(1, 36) = 117,1, p < 0,0001$) e da intervenção ($F(1, 36) = 9,936, p = 0,0033$). Observou-se que o fator idade exerceu efeito de magnitude elevada ($\eta^2_p = 0,765$), enquanto a intervenção contribuiu de forma relevante ($\eta^2_p = 0,216$). Em contrapartida, a interação da idade x intervenção apresentou efeito muito pequeno ($\eta^2_p = 0,003$), indicando ausência de modulação relevante entre os fatores. Esses resultados sugerem que as alterações observadas são predominantemente explicadas pela idade, com contribuição adicional da intervenção, sem evidência de efeito interativo. O teste *post hoc* mostrou redução significativa na exploração do objeto por ratas senis (VSL#3 e NaCl) em comparação com ratas adultas ($p < 0,001$ e $p < 0,0001$, respectivamente).

Análise do reconhecimento de objetos

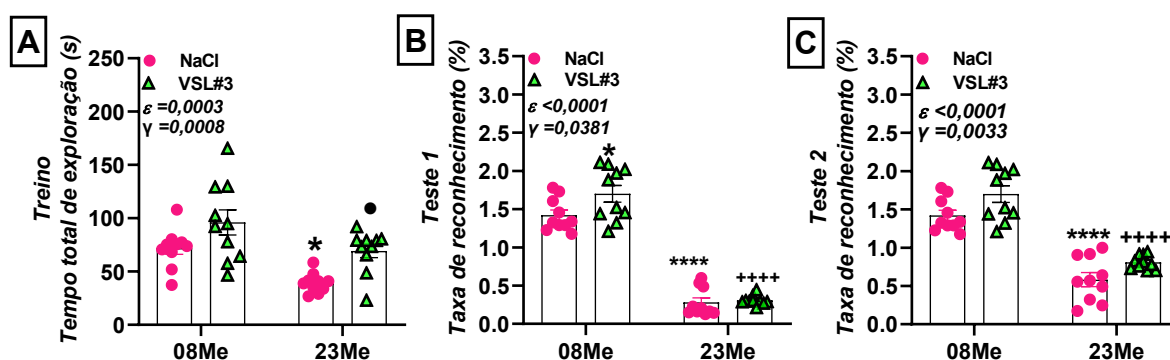


Figura 15. Análise do reconhecimento de objetos, realizada em ratas Wistar adultas (08 meses – 08Me) e senis (23 meses – 23Me) após 42 dias de suplementação com solução salina (NaCl) ou probiótico (VSL#3). (A) Tempo total de exploração do treino (B) Teste 1; (C) Teste 2. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA duas vias: (γ) intervenção; (ϵ) idade. Teste *post hoc* de Tukey: * $p = 0,05$; **** $p < 0,0001$; • $p = 0,0333$. * vs. 08Me/NaCl; • vs. 23Me/VSL#3; + vs. 08Me/VSL#3.

4.6.4 Teste de deambulação

O teste de pegada foi realizado para avaliar parâmetros funcionais locomotores,

considerando que o desempenho motor reflete a integração dos sistemas neural, muscular e esquelético e diminui progressivamente com o envelhecimento. Foram analisadas a largura da passada, o comprimento da passada e o tempo total para atravessar o aparato (Fig. 16).

Os resultados dos parâmetros da largura da passada (Fig. 16A) revelaram interação significativa entre idade e intervenção ($F(1, 36) = 5,823$, $p = 0,0210$). Os tamanhos de efeito indicaram contribuição da interação ($\eta^2_p = 0,139$) e da idade ($\eta^2_p = 0,079$), enquanto a intervenção apresentou efeito desprezível ($\eta^2_p = 0,001$). A análise *post hoc* revelou aumento na largura da passada no grupo de ratas senis/NaCl, em comparação com as ratas adultas/NaCl ($p = 0,0273$).

Para o comprimento da passada (Fig. 16B), a ANOVA de duas vias, revelou efeito principal da intervenção ($F(1, 36) = 24,01$, $p < 0,0001$), com grande magnitude ($\eta^2_p = 0,400$). Os efeitos da idade ($\eta^2_p = 0,030$) e da interação ($\eta^2_p = 0,001$) foram pequenos ou desprezíveis, indicando predominância da intervenção na variabilidade do desfecho. O teste *post hoc* mostrou aumento do comprimento da passada nos grupos tratados com VSL#3 em comparação aos respectivos grupos que receberam NaCl da mesma idade (adultas: $p = 0,0051$; senis: $p = 0,0102$).

Na análise do tempo total de caminhada para percorrer o aparato (Fig. 16C), observou-se efeito principal da intervenção ($F(1, 36) = 14,99$, $p = 0,0004$). O tamanho de efeito foi elevado para a intervenção ($\eta^2_p = 0,294$), moderado para idade ($\eta^2_p = 0,101$) e negligenciável para a interação ($\eta^2_p = 0,003$), sinalizando que o tempo total para percorrer o aparato está relacionado a intervenção, com contribuição secundária da idade. A análise *post hoc* revelou redução do tempo de travessia das ratas senis que receberam o probiótico em relação aos animais da mesma idade que receberam solução salina ($p = 0,0272$).

Análise do teste de deambulação

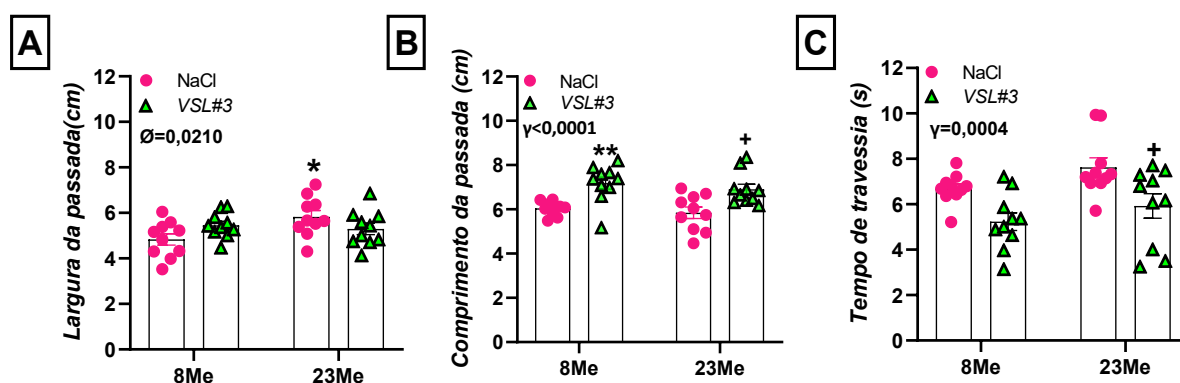


Figura 16. Teste de deambulação realizado em ratas Wistar adultas (08 meses – 08Me) e senis (23 meses – 23Me) após 42 dias da administração de solução salina (NaCl) ou suplementação do probiótico (VSL#3). (A) Largura da passada; (B) Comprimento da passada; (C) Tempo total do teste de deambulação. Os valores são apresentados como média $\pm$ EPM. ANOVA bidirecional: (Φ) Interação idade + intervenção; (γ) intervenção; Teste *post hoc* de Tukey: * $p=0,0273$; ** $p=0,0051$; • $p<0,050$. * vs. 8Me/NaCl; • vs. 23Me/NaCl.

5 DISCUSSÃO

Este estudo investigou os efeitos da suplementação com probióticos sobre sistemas fisiológicos em ratas adultas e em ratas durante a periostropausa. Os resultados demonstram que a suplementação probiótica exerceu efeitos que variaram de acordo com a condição fisiológica associada ao envelhecimento reprodutivo, atuando predominantemente sobre vias fisiológicas periféricas. A suplementação com VSL#3 promoveu melhora consistente da integridade da mucosa intestinal em diferentes segmentos do intestino delgado e reduziu a degranulação de mastócitos no mesentério. Esses efeitos foram acompanhados por atenuação do estresse oxidativo sistêmico, particularmente em ratas senis. Além disso, essas adaptações periféricas coincidiram com a redução do comportamento do tipo ansioso e com a melhora do desempenho locomotor, sugerindo possível relevância funcional das alterações fisiológicas observadas. Em contraste, a suplementação probiótica não melhorou significativamente a memória de reconhecimento de objetos novos nem modificou o estado redox do hipocampo, indicando dissociação entre as respostas periféricas e centrais. Em conjunto, esses achados sugerem que os efeitos benéficos do VSL#3 podem envolver interações do intestino e o sistema imunológico, bem como a modulação do estado redox periférico, o que pode contribuir para a redução do comportamento do tipo ansioso e para a melhora do desempenho locomotor, embora exerça efeitos limitados sobre o equilíbrio oxidativo hipocampal e a função cognitiva.

A predominância do diestro em ratas senis reflete alterações neuroendócrinas e ovarianas progressivas, incluindo comprometimento da ovulação, depleção da reserva folicular e redução da responsividade ovariana às gonadotrofinas, resultando, em última análise, em irregularidade do ciclo estral e diminuição da produção de hormônios ovarianos (LEFEVRE; MCCLINTOCK, 1988; LIU et al., 2025). Em concordância com essas observações, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram concentrações plasmáticas de estradiol marcadamente reduzidas (0,032 ng/mL) em ratas de 21 meses durante a periostropausa (NICOLA et al., 2021; STRINGHETTA-GARCIA et al., 2017; ESPERANÇA et al., 2024).

corroborando a presença de alterações endócrinas características da transição reprodutiva. Considerando que o declínio dos níveis de estrogênio constitui um dos principais fatores responsáveis pelas alterações neurobiológicas, metabólicas e imunológicas associadas ao envelhecimento reprodutivo, as irregularidades do ciclo estral observadas no presente estudo reforçam a relevância translacional deste modelo experimental para a investigação das alterações fisiológicas associadas à transição da periostropausa.

As modificações sistêmicas associadas à inflamação crônica de baixo grau e à disfunção do eixo intestino-cérebro podem estar correlacionadas ao processo de envelhecimento reprodutivo (MCCARTHY; RAVAL, 2020; YU et al., 2025; NIETO et al., 2025; BUFORD, 2017). Nesse contexto, a análise histomorfométrica do intestino delgado de ratas senis demonstrou alterações estruturais significativas na mucosa intestinal, caracterizadas pela redução da altura das vilosidades, aumento da profundidade das criptas e diminuição da relação vilosidade/cripta no duodeno, jejuno e íleo (Figs. 4 e 5). Do ponto de vista mecanístico, essas alterações podem estar relacionadas ao comprometimento da atividade das células-tronco intestinais, decorrente da desregulação de vias de sinalização envolvidas na renovação epitelial, como a via Wnt/ β -catenina, além do aumento do estresse oxidativo (GEHART; CLEVERS, 2019; CUI et al., 2012). Consequentemente, a redução da capacidade regenerativa da mucosa pode aumentar a suscetibilidade a lesões epiteliais, comprometer a absorção de nutrientes e favorecer alterações na composição da microbiota intestinal (ZHANG et al., 2023). O aumento da profundidade das criptas observado nas ratas senis pode refletir resposta hiperproliferativa compensatória associada à inflamação crônica de baixo grau e ao aumento da renovação epitelial, ambos reconhecidos como características do envelhecimento intestinal (NALAPAREDDY et al., 2022). Dessa forma, a redução da relação vilosidade/cripta observada nesses animais representa importante indicador do comprometimento da integridade da mucosa e da função absorptiva. Além de impactar a absorção de nutrientes, essas alterações estruturais podem comprometer a função da barreira intestinal, facilitando a translocação de produtos microbianos e contribuindo para a manutenção da inflamação sistêmica. Notavelmente, a suplementação com VSL#3 atenuou parcialmente essas alterações, promovendo aumento da altura das vilosidades, redução da profundidade das criptas e melhora da relação vilosidade/cripta, sugerindo efeito protetor sobre a arquitetura intestinal. Esses

achados são consistentes com evidências anteriores que demonstram que os probióticos podem promover a homeostase epitelial por meio da modulação da microbiota intestinal, da atenuação dos processos inflamatórios e do fortalecimento da função de barreira (HEMARAJATA; VERSALOVIC, 2013; AZAD et al., 2018).

Dessa forma, essas alterações intestinais podem favorecer a disfunção da barreira intestinal e contribuir para o estabelecimento de ambiente pró-inflamatório frequentemente observado durante o envelhecimento. A redução do número total de mastócitos mesentéricos em ratas senis (Fig. 6A) é consistente com o remodelamento do sistema imunológico relacionado à idade e com a imunossenescência. Embora os mastócitos íntegros tenham predominado em ambos os grupos (Fig. 6B e C), a suplementação com VSL#3 reduziu significativamente a proporção de mastócitos degranulados nas ratas senis (Fig. 6D), sugerindo efeito imunomodulador do probiótico. Os mastócitos são reguladores essenciais da homeostase imunológica intestinal, e sua degranulação tem sido associada à disfunção linfática, ao recrutamento alterado de células imunológicas e à manutenção de processos inflamatórios crônicos durante o envelhecimento (CHATTERJEE; GASHEV, 2012; EKMEKCIU et al., 2017). Além disso, a ativação dos mastócitos promove a liberação de mediadores pró-inflamatórios e de espécies reativas de oxigênio, contribuindo para o desequilíbrio oxidativo sistêmico. Portanto, a menor proporção de mastócitos degranulados observada nas ratas senis suplementadas com VSL#3 sugere ambiente intestinal menos inflamatório, o que ocorreu concomitantemente à atenuação do estresse oxidativo sistêmico e a outros efeitos periféricos observados no presente estudo.

Nossos dados demonstraram alterações marcantes na homeostase redox, caracterizadas pelo aumento da peroxidação lipídica e pelo comprometimento de importantes mecanismos de defesa antioxidante em ratas senis. Os níveis elevados de TBARS plasmático observados nas ratas senis indicam aumento do dano oxidativo associado ao envelhecimento, enquanto sua redução após a suplementação com VSL#3 sugere atenuação do ambiente pró-oxidante característico dessa fase. Embora os níveis de proteínas carboniladas não tenham apresentado alterações significativas, esse achado pode refletir a dinâmica de renovação das proteínas oxidadas e a sensibilidade limitada desse biomarcador em condições fisiológicas complexas, como a transição da peri menopausa (KEHM et al., 2021). Além disso, apesar do aumento da capacidade antioxidante total observado nas ratas senis, a redução concomitante dos

níveis de GSH e das atividades da catalase (CAT) e da glutathiona peroxidase (GPx) indica que as respostas antioxidantes compensatórias foram insuficientes para manter o equilíbrio redox. Em conjunto, esses achados sugerem que o envelhecimento reprodutivo promoveu estado pró-oxidante sustentado, resultante tanto do aumento da geração de espécies reativas quanto do comprometimento progressivo das defesas antioxidantes endógenas. Nesse contexto, o VSL#3 exerceu efeito protetor parcial ao reduzir o dano oxidativo sistêmico, embora sem restaurar completamente a funcionalidade do sistema antioxidante.

Em contraste com os efeitos periféricos observados, a suplementação com VSL#3 não modificou significativamente os parâmetros redox no hipocampo. As ratas senis apresentaram aumento da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas no hipocampo, acompanhado por elevação da capacidade antioxidante total, dos níveis de GSH e das atividades das enzimas antioxidantes, sugerindo a ativação de mecanismos antioxidantes compensatórios em resposta ao aumento do estresse oxidativo. No entanto, a persistência do dano oxidativo, apesar da intensificação das defesas antioxidantes, indica que essas respostas adaptativas foram insuficientes para restaurar a homeostase redox. A dissociação entre os efeitos sistêmicos benéficos do VSL#3 e a ausência de alterações significativas no hipocampo sugere que as vias periféricas permanecem responsivas à intervenção probiótica durante a fase de transição reprodutiva, enquanto os mecanismos centrais responsáveis pela regulação da homeostase oxidativa podem ser comparativamente menos responsivos. Diversos mecanismos associados ao envelhecimento cerebral, incluindo a disfunção da barreira hematoencefálica, a neuroinflamação crônica, o comprometimento mitocondrial e a redução da disponibilidade de estrogênio, têm sido implicados na manutenção do desequilíbrio oxidativo no hipocampo durante o envelhecimento (DEVRAJ et al., 2025; CUI; SHEN; LI, 2013; BRINTON, 2008). Consequentemente, esses mecanismos podem limitar o impacto das vias regulatórias periféricas sobre o estado redox hipocampal, mesmo na presença de melhorias no equilíbrio oxidativo sistêmico.

As avaliações comportamentais revelaram desempenho exploratório alterado durante a fase de treinamento e prejuízo na memória de reconhecimento durante os Testes 1 e 2 nas ratas senis (Fig. 13). Essa análise baseia-se na propensão natural dos roedores de explorar objetos novos por mais tempo do que objetos familiares quando ambos são apresentados simultaneamente durante o teste. Considerando o

ação central do hipocampo nos processos de aprendizagem e consolidação da memória, esses achados podem estar associados ao desequilíbrio redox observado nessa estrutura. O aumento da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas indica um ambiente celular desfavorável à manutenção da integridade neuronal e da plasticidade sináptica, processos essenciais para a formação e o armazenamento da memória (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; MALENKA; BEAR, 2004; BUTTERFIELD; HALLIWELL, 2019). Além disso, o estresse oxidativo persistente pode comprometer a função mitocondrial, reduzindo a disponibilidade de energia necessária para a neurotransmissão e para mecanismos dependentes de plasticidade, como a LTP (MATTSON; GLEICHMANN; CHENG, 2008). Assim, a interação do dano oxidativo, a disfunção mitocondrial e o comprometimento da plasticidade sináptica pode representar mecanismo central subjacente ao declínio cognitivo durante o envelhecimento reprodutivo (LEJRI; GRIMM; ECKERT, 2018).

Os efeitos do VSL#3 sobre a função cognitiva parecem depender das condições fisiológicas e experimentais. Embora a suplementação com probióticos tenha sido associada à melhora do desempenho cognitivo e ao aumento da expressão de fatores relacionados à plasticidade sináptica em alguns estudos (DISTRUTTI et al., 2014), efeitos limitados ou ausentes também foram relatados em modelos de envelhecimento avançado ou de neurodegeneração (BEILHARZ et al., 2018; KAUR et al., 2020). No presente estudo, o VSL#3 não promoveu melhora na memória de reconhecimento, apesar de seus efeitos benéficos sobre parâmetros periféricos, corroborando a hipótese de que a modulação sistêmica, por si só, foi insuficiente para reverter as alterações hipocâmpais já estabelecidas. Essa menor responsividade pode estar relacionada a processos neuroinflamatórios associados ao envelhecimento, à disfunção mitocondrial e à redução da disponibilidade de estrogênio, fatores que podem comprometer a plasticidade sináptica e limitar a eficácia de intervenções dependentes do BDNF e de vias relacionadas à LTP (FLANNERY et al., 2025). Entretanto, o melhor desempenho na fase de aquisição observado nas ratas senis sugere possível influência do VSL#3 sobre os processos atencionais ou motivacionais envolvidos na codificação das informações, indicando que o probiótico pode facilitar as etapas iniciais do processamento da informação, embora exerça efeitos limitados sobre a consolidação da memória dependente do hipocampo.

Os achados comportamentais indicam que a suplementação com VSL#3 induziu fenótipo compatível com efeito do tipo ansiolítico. Nas ratas adultas, o aumento

do tempo de permanência nos braços abertos do teste do labirinto em cruz elevado (Fig. 9) foi acompanhado por redução do tempo nos braços fechados e aumento dos comportamentos exploratórios. A análise etológica reforça esse perfil, uma vez que comportamentos como o levantar-se sobre as patas traseiras e a imersão da cabeça são considerados indicadores de avaliação de risco e processamento emocional (HEINZ et al., 2021). Nas ratas senis, a suplementação aumentou tanto o tempo de permanência quanto a frequência de entradas nos braços abertos, sugerindo redução seletiva da inibição comportamental relacionada à percepção de risco. Embora esses efeitos tenham sido parciais, sua magnitude indica influência consistente sobre sistemas neurocomportamentais envolvidos no processamento emocional. Os efeitos do tipo ansiolítico observados após a suplementação com VSL#3 ocorreram concomitantemente à redução da degranulação de mastócitos identificada nas ratas senis. Embora relação mecanicista direta não tenha sido avaliada no presente estudo, mediadores inflamatórios derivados dos mastócitos têm sido implicados nas vias de comunicação entre o intestino e o cérebro, bem como em circuitos neurais envolvidos na regulação emocional (ZHOU et al., 2025; WARREN et al., 2024). Portanto, a modulação da atividade imunológica intestinal observada após a suplementação probiótica pode representar um dos diversos fatores periféricos potencialmente associados aos efeitos comportamentais detectados no teste do labirinto em cruz elevado.

A dissociação entre a melhora do comportamento do tipo ansioso e a ausência de melhora cognitiva sugere que os diferentes domínios comportamentais afetados pelo VSL#3 podem apresentar respostas distintas à suplementação probiótica durante o envelhecimento reprodutivo. Enquanto foram observadas melhorias nos parâmetros relacionados à ansiedade, a memória de reconhecimento permaneceu comprometida e não foram detectadas modificações significativas nos parâmetros redox do hipocampo. Esses achados indicam que as adaptações periféricas promovidas pelo VSL#3 não foram acompanhadas por melhorias mensuráveis em desfechos associados ao hipocampo, reforçando a distinção entre as respostas comportamentais e fisiológicas observadas no presente estudo.

Além de seus efeitos sobre o comportamento emocional, a suplementação com VSL#3 melhorou o desempenho locomotor, evidenciado pelo aumento do comprimento da passada e pela redução do tempo de travessia, particularmente nas ratas senis (Fig. 14). Esses efeitos podem estar parcialmente associados à redução

da ansiedade, uma vez que estados elevados de ansiedade estão relacionados a padrões motores mais rígidos e menos eficientes (ARSLANOVA et al., 2021). Além disso, a atenuação da ativação de mastócitos e do estresse oxidativo sistêmico sugere o estabelecimento de ambiente fisiológico mais favorável para a função motora. Evidências recentes sustentam a existência de eixo intestino-músculo, por meio do qual mecanismos associados ao intestino podem influenciar o metabolismo do músculo esquelético e o desempenho físico. Em idosos com fragilidade leve, a suplementação com *Lactobacillus plantarum* TWK10 foi associada à melhora da força muscular e do desempenho funcional (LEE et al., 2021). Embora os mecanismos responsáveis pela melhora do desempenho locomotor não tenham sido investigados diretamente, estudos anteriores sugerem que metabólitos derivados da microbiota e vias associadas ao intestino podem influenciar a função do músculo esquelético e o desempenho físico (XU; HE, 2025; TICINESI et al., 2019). Portanto, os presentes achados levantam a possibilidade de que as adaptações fisiológicas periféricas induzidas pelo VSL#3 tenham contribuído para a melhora do desempenho locomotor observada nas ratas senis, hipótese que merece ser investigada em estudos futuros.

Nosso estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas na interpretação dos resultados. Primeiramente, a ausência da caracterização da microbiota intestinal impede a identificação de alterações taxonômicas associadas à suplementação com VSL#3 e limita a interpretação dos mecanismos mediados pela microbiota. Em segundo lugar, não foram avaliados metabólitos microbianos potencialmente envolvidos nas vias de comunicação entre o intestino e o cérebro e entre o intestino e o músculo, como os AGCC. Além disso, não foi realizado o perfil hormonal, impossibilitando avaliação mais abrangente das interações do envelhecimento reprodutivo, o estado endócrino e os efeitos do probiótico. Por fim, citocinas inflamatórias, fatores neurotróficos e marcadores de neuroinflamação não foram analisados, limitando a compreensão mecanicista da aparente dissociação entre as respostas sistêmicas e hipocâmpais à suplementação com VSL#3. Estudos futuros que integrem a caracterização da microbiota, o perfil hormonal e metabólico, bem como análises moleculares, serão importantes para esclarecer as vias pelas quais o VSL#3 influencia os desfechos fisiológicos e comportamentais durante o envelhecimento reprodutivo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a suplementação com VSL#3 exerceu efeitos que variaram de acordo com a condição fisiológica associada ao envelhecimento reprodutivo, influenciando predominantemente vias fisiológicas periféricas. Em ratas no período da senescência reprodutiva, o tratamento com o probiótico reduziu a degranulação de mastócitos e o estresse oxidativo sistêmico; esses efeitos foram acompanhados pela redução do comportamento do tipo ansioso e pela melhora do desempenho locomotor. Em contraste, o VSL#3 não modificou significativamente o estado redox hipocampal nem restaurou a memória de reconhecimento, indicando dissociação entre as respostas periféricas e centrais à suplementação. Esses achados sugerem que a intervenção com probióticos pode promover adaptações benéficas associadas às interações do intestino e o sistema imunológico, bem como à modulação do estado redox periférico durante o processo de envelhecimento reprodutivo, embora exerça efeitos limitados sobre a função cognitiva dependente do hipocampo. Em conjunto, os resultados reforçam o potencial do VSL#3 como estratégia para atenuar alterações fisiológicas e comportamentais específicas associadas ao envelhecimento reprodutivo feminino.

7 REFERÊNCIAS

- ABILDINOVA, G. Z. et al. The gut-brain-metabolic axis: exploring the role of microbiota in insulin resistance and cognitive function. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1463958, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1463958.
- ADAK, A.; KHAN, M. R. An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 76, n. 3, p. 473–493, 2019. DOI: 10.1007/s00018-018-2943-4.
- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121 – 126, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).
- AIMONE, J. B; LEE, S. W; CLEMENSON, G. D; DENG, W; GAGE, F. H. Regulation and function of adult neurogenesis: from genes to cognition. *Physiological Reviews*, v. 94, n. 4, p. 991 – 1026, Oct. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2014>.
- ALBERT-BAYO, M.; PARACUELLOS, I.; GONZÁLEZ-CASTRO, A. M.; RODRÍGUEZ-URRUTIA, A.; RODRÍGUEZ-LAGUNAS, M. J.; ALONSO-COTONER, C.; SANTOS, J.; VICARIO, M. Intestinal mucosal mast cells: key modulators of barrier function and homeostasis. *Cells*, [S.I.], v. 8, n. 2, p. 135, 2019. DOI: 10.3390/cells8020135.

ALHAZZAA, O. A.; ABAHUSSIN, H. M.; MAJRASHI, M. A.; ALOTAIBI, M. S.; ALKHRAYEF, M. N.; ALHAMDAN, Z. A.; ALAWAD, A. O. Molecular pathways linking chronic psychological stress to accelerated aging: mechanisms and interventions. *Frontiers in Aging*, v. 7, 1743142, 2026. DOI: 10.3389/fragi.2026.1743142.

AMORIM, J. A.; COPPOTELLI, G.; ROLO, A. P. et al. Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 18, n. 4, p. 243–258, abr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41574-021-00626-7>.

ANTUNES, M.; BIALA, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cognitive Processing*, v. 13, n. 2, p. 93–110, 2012. DOI: 10.1007/s10339-011-0430-z.

ARSLANOVA, A.; TARASOVA, A.; ALEXANDROVA, A.; NOVOSELOVA, V.; SHAIDULLOV, I.; KHUSNUTDINOVA, D.; et al. Protective effects of probiotics on cognitive and motor functions, anxiety level, visceral sensitivity, oxidative stress and microbiota in mice with antibiotic-induced dysbiosis. *Life*, v. 11, n. 8, p. 764, 2021. DOI: 10.3390/life11080764.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2014, p. 360438, 2014. DOI: 10.1155/2014/360438.

AZAD, M. A. K.; SARKER, M.; LI, T.; YIN, J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *BioMed Research International*, v. 2018, p. 1–8, 2018. DOI: 10.1155/2018/9478630.

BACON, E. R.; BRINTON, R. D. Epigenetics of the developing and aging brain: Mechanisms that regulate onset and outcomes of brain reorganization. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 125, p. 503–516, jun. 2021. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2021.02.040.

BAKER, J. M.; AL-NAKKASH, L.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Estrogen-gut microbiome axis: physiological and clinical implications. *Maturitas*, v. 103, p. 45–53, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.06.025>.

BAKKEREN, E.; PISKOVSKY, V.; FOSTER, K. R. Metabolic ecology of microbiomes: nutrient competition, host benefits, and community engineering. *Cell Host & Microbe*, v. 33, n. 6, p. 790–807, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2025.05.013>.

BALOUGH, J. L.; DIPALI, S. S.; VELEZ, K.; KUMAR, T. R.; DUNCAN, F. E. *Hallmarks of female reproductive aging in physiologic aging mice*. *Nature Aging*, v. 4, p. 1711–

1730, 2024. DOI: 10.1038/s43587-024-00769-y.

BARBIERI, R. L. The endocrinology of the menstrual cycle. *Methods in Molecular Biology*, v. 1154, p. 145-169, 2014. DOI: 10.1007/978-1-4939-0659-8_7.

BARREA, L. et al. Probiotics and prebiotics: any role in menopause-related diseases? *Current Nutrition Reports*, v. 12, n. 1, p. 83-97, 2023. DOI: 10.1007/s13668-023-00462-3. Epub 7 fev. 2023.

BEILHARZ, J. E.; KAAKOUSH, N. O.; MANIAM, J.; MORRIS, M. J. Cafeteria diet and probiotic therapy: cross talk among memory, neuroplasticity, serotonin receptors and gut microbiota in the rat. *Molecular Psychiatry*, v. 23, n. 2, p. 351–361, 2018. DOI: 10.1038/mp.2017.38.

BEMARK, M.; PITCHER, M. J.; DIONISI, C.; SPENCER, J. Gut-associated lymphoid tissue: a microbiota-driven hub of B cell immunity. *Trends in Immunology*, v. 45, n. 3, p. 211-223, mar. 2024. DOI: 10.1016/j.it.2024.01.006.

BENDIS, P. C.; ZIMMERMAN, S.; ONISIFOROU, A.; ZANOS, P.; GEORGIU, P. The impact of estradiol on serotonin, glutamate, and dopamine systems. *Frontiers in Neuroscience*, v. 18, p. 1348551, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1348551>.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v. 239, n. 1, p. 70 – 76, July 1996. DOI: <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for determining blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 61, p. 882–888, 1963.

BOSE, S.; SHARAN, K. Effect of probiotics on postmenopausal bone health: a preclinical meta-analysis. *British Journal of Nutrition*, v. 131, n. 4, p. 567-580, 2024. DOI: 10.1017/S0007114523002362. Epub 23 out. 2023.

BOURGONJE, A. R. et al. Systemic oxidative stress is increased in postmenopausal women and independently associates with homocysteine levels. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 1, p. 314, 2020. DOI: 10.3390/ijms21010314.

BRINTON, R. D. Estrogen regulation of glucose metabolism and mitochondrial function: therapeutic implications for prevention of Alzheimer's disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 13–14, p. 1504–1511, 2008.

BRINTON, R. D. Minireview: translational animal models of human menopause:

challenges and emerging opportunities. *Endocrinology*, v. 153, n. 8, p. 3571 – 3578, Aug. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1210/en.2012-1340>.

BRINTON, R. D; YAO, J; YIN, F; MACK, W. J; CADENAS, E. Perimenopause as a neurological transition state. *Nature Reviews Endocrinology*, v. 11, p. 393 – 405, May 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.82>.

BROWN, H.; ESTERHÁZY, D. Intestinal immune compartmentalization: implications of tissue-specific determinants in health and disease. *Mucosal Immunology*, v. 14, p. 1259–1270, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41385-021-00420-8>.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302–310, 1978. DOI: [10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).

BUFORD, T. W. (Dis)Trust your gut: the gut microbiome in age-related inflammation, health, and disease. *Microbiome*, v. 5, n. 1, p. 80, 2017. DOI: [10.1186/s40168-017-0296-0](https://doi.org/10.1186/s40168-017-0296-0).

BUSTAMANTE-BARRIENTOS, F. A. et al. *The impact of estrogen and estrogen-like molecules in neurogenesis and neurodegeneration: beneficial or harmful?* *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 15, p. 636176, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.636176>.

BUTTERFIELD, D. A.; HALLIWELL, B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 20, n. 3, p. 148–160, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0132-6>.

BYTYÇI, I.; HENEIN, M. Y. Stride length predicts adverse clinical events in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Medicine*, v. 10, n. 12, 2670, 2021. DOI: [10.3390/jcm10122670](https://doi.org/10.3390/jcm10122670).

CAMAIONI, A.; UCCI, M. A.; CAMPAGNOLO, L.; DE FELICI, M.; KLINGER, F. G. The process of ovarian aging: it is not just about oocytes and granulosa cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, [S.l.], v. 39, p. 783–792, 2022. DOI: [10.1007/s10815-022-02478-0](https://doi.org/10.1007/s10815-022-02478-0).

CARÍAS DOMÍNGUEZ, A. M.; DE JESÚS ROSA SALAZAR, D.; STEFANOLO, J. P.; CRUZ SERRANO, M. C.; CASAS, I. C.; ZULUAGA PEÑA, J. R. Intestinal dysbiosis: exploring definition, associated symptoms, and perspectives for a comprehensive understanding – a scoping review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 17, n. 1, p. 440–449, 2025. DOI: [10.1007/s12602-024-10353-w](https://doi.org/10.1007/s12602-024-10353-w).

CASATI, L.; CICERI, S.; MAGGI, R.; BOTTAI, D. Physiological and pharmacological overview of the gonadotropin-releasing hormone. *Biochemical Pharmacology*, v. 212, p. 115553, 2023. DOI: [10.1016/j.bcp.2023.115553](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115553).

CAYA-BISSONNETTE, L.; BÉŦQUE, J. C. *Half a century legacy of long-term potentiation*. *Current Biology*, v. 34, n. 13, p. R640–R662, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2024.05.008>.

CHATTERJEE, V.; GASHEV, A. A. Mast cell-mediated regulation of lymphatic function in inflammation. *Frontiers in Immunology*, v. 3, p. 260, 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00260.

CHAUDHRY, T. S. et al. The impact of microbiota on the gut-brain axis: examining the complex interplay and implications. *Journal of Clinical Medicine*, v. 12, n. 16, p. 5231, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm12165231>.

CHEN, P.; LI, B.; OU-YANG, L. Role of estrogen receptors in health and disease. *Frontiers in Endocrinology*, v. 13, p. 839005, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.839005>.

CHENG, F. S. et al. Probiotic mixture VSL#3: an overview of basic and clinical studies in chronic diseases. *World Journal of Clinical Cases*, v. 8, n. 8, p. 1361-1384, 2020. DOI:10.12998/wjcc.v8.i8.1361.

CHO, J. M. et al. Beyond hot flashes: estrogen receptors in menopausal mental health. *Brain Sciences*, v. 15, n. 9, p. 1003, 2025. DOI: 10.3390/brainsci15091003.

CONTI, P. et al. Impact of mast cells in mucosal immunity of intestinal inflammation: inhibitory effect of IL-37. *European Journal of Pharmacology*, v. 818, p. 294-299, 5 jan. 2018. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.09.044.

CRISPIM-JUNIOR, C. F; PEDERIVA, C. N; BOSE, R. C; GARCIA, V. A; LINO-DE OLIVEIRA, C; MARINO-NETO, J. ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. *Computers in Biology and Medicine*, n. 2, p. 257 – 264, Feb. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2011.12.002>.

CRUSIO, W.; SCHWEGLER, H.; VAN ABEELEN, J. Behavioral responses to novelty and structural variation of the hippocampus in mice. I. Quantitative-genetic analysis of behavior in the open-field. *Behavioural Brain Research*, v. 32, p. 75–80, 1989. DOI: 10.1016/S0166-4328(89)80074-9.

CUI, H.; KONG, Y.; ZHANG, H. Homeostasis of carbohydrates and reactive oxygen species is critically changed in the brain of middle-aged mice: molecular mechanisms and functional implications. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 44, n. 6, p. 523–530, 2012. DOI: 10.1093/abbs/gms036.

CUI, J.; SHEN, Y.; LI, R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from

periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*, v. 19, n. 3, p. 197–209, 2013.

DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 9, p. 46–56, 2008. DOI: 10.1038/nrn2297.

DAVIS, S. R.; PINKERTON, J.; SANTORO, N.; SIMONCINI, T. Menopause: biology, consequences, supportive care, and therapeutic options. *Cell*, v. 186, n. 19, p. 4038–4058, 14 set. 2023. DOI: 10.1016/j.cell.2023.08.016.

DEVRAJ, K.; KULKARNI, O.; LIEBNER, S. Regulation of the blood-brain barrier function by peripheral cues in health and disease. *Metabolic Brain Disease*, v. 40, n. 1, p. 61, 2025. DOI: 10.1007/s11011-024-01468-8.

DI VINCENZO, F. et al. Gut microbiota, intestinal permeability, and systemic inflammation: a narrative review. *Internal and Emergency Medicine*, v. 19, n. 2, p. 275–293, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11739-023-03374-w>.

DILEEPAN, K. N. et al. Mast cell-mediated immune regulation in health and disease. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, v. 10, p. 1213320, 17 ago. 2023. DOI: 10.3389/fmed.2023.1213320.

DISTRUTTI, E.; O'REILLY, J. A.; MCDONALD, C.; CIPRIANI, S.; RENG, B.; LYNCH, M. A.; FIORUCCI, S. Modulation of intestinal microbiota by the probiotic VSL#3 resets brain gene expression and ameliorates the age-related deficit in LTP. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, e106503, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0106503.

DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, v. 14, n. 1, p. 20–32, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3552>.

EKMEKCIU, I.; VON KLITZING, E.; FIEBIGER, U.; NEUMANN, C.; BACHER, P.; SCHEFFOLD, A.; et al. The probiotic compound VSL#3 modulates mucosal, peripheral, and systemic immunity following murine broad-spectrum antibiotic treatment. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 7, p. 167, 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00167.

ESPERANÇA, T. D.; STRINGHETTA-VILLAR, B. P.; CAVALCANTE, D. P.; DOURADINHO, L. G.; FIAIS, G. A.; PEREIRA, R.; et al. Analysis of the cognitive and functional behavior of female rats in the periostropause after hormone therapy with estrogen. *Behavioural Brain Research*, v. 462, p. 114866, 2024. DOI: 10.1016/j.bbr.2024.114866.

FERREIRA, L. B.; NICOLA, A. C.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; DORNELLES, R. C. M.

Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: preliminary findings. *Experimental Gerontology*, v. 72, p. 157–161, 2015. DOI: 10.1016/j.exger.2015.10.003.

FINCH, C. E. The menopause and aging, a comparative perspective. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 142, p. 132–141, 2014. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2013.03.010.

FINNEY, C. A. et al. Estradiol regulates hippocampal function and memory through multiple signaling pathways. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 55, 100788, 2019. DOI: 10.1016/j.yfrne.2019.100788.

FLANNERY, J. C.; TIRRELL, P. S.; BAUMGARTNER, N. E.; DANIEL, J. M. Neuroestrogens, the hippocampus, and female cognitive aging. *Hormones and Behavior*, v. 170, p. 105710, 2025. DOI: 10.1016/j.yhbeh.2025.105710.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada: FAO/WHO Working Group, 2002.

FREEMAN, M. E. The ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (ed.). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1977. p. 189–217.

FRYE, C. A.; PETRALIA, S. M.; RHODES, M. E. Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 67, n. 3, p. 587–596, 2000. DOI: 10.1016/S0091-3057(00)00392-0.

FUJISAKA, S.; WATANABE, Y.; TOBE, K. The gut microbiome: a core regulator of metabolism. *Journal of Endocrinology*, v. 256, n. 3, e220111, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1530/JOE-22-0111>.

FURINI, C. R. G.; NACHTIGALL, E. G.; BEHLING, J. A. K.; ASSIS BRASIL, E. S.; SAENGER, B. F.; NARVAES, R. F. et al. Molecular mechanisms in hippocampus involved on object recognition memory consolidation and reconsolidation. *Neuroscience*, v. 435, p. 112–123, 2020. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.03.047.

GEHART, H.; CLEVERS, H. Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 16, p. 19–34, 2019. DOI: 10.1038/s41575-018-0081-y.

GHOSH, S. et al. Estrogen signaling and gut microbiota: a bidirectional relationship influencing host metabolism and immune response. *Frontiers in Endocrinology*, v. 13, p. 1–15, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022>.

GIONCHETTI, P.; LAMMERS, K. M.; RIZZELLO, F.; CAMPIERI, M. VSL#3: an

analysis of basic and clinical contributions in probiotic therapeutics. *Gastroenterology Clinics of North America*, v. 34, n. 3, p. 499-513, 2005. DOI: 10.1016/j.gtc.2005.05.003.

GUO, C. et al. Effects of a plant-based diet rich in seeds on gut microbiota and brain activity. *Scientific Reports*, v. 15, p. 17444, 2025. DOI: 10.1038/s41598-025-99406-w.

GUO, H. et al. Effects of probiotics on cognitive function across the human lifespan: a meta-analysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 80, n. 1, p. 46-61, 2026. DOI: 10.1038/s41430-025-01660-8.

HAMILTON-MILLER, J. M.; GIBSON, G. R.; BRUCK, W. Some insights into the derivation and early uses of the word 'probiotic'. *British Journal of Nutrition*, v. 90, n. 4, p. 845, 2003. DOI: 10.1079/bjn2003954.

HAN, Y. et al. Role and regulatory mechanism of inhibin in animal reproductive system. *Theriogenology*, v. 202, p. 10–20, 2023. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2023.02.016.

HARLOW, S. D.; GASS, M.; HALL, J. E.; LOBO, R.; MAKI, P.; REBAR, R. W. et al. Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop +10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. *Menopause*, v. 19, n. 4, p. 387–395, 2012. DOI: 10.1097/gme.0b013e31824d8f40.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, v. 48, n. 2, p. 422–427, 1972.

HEINZ, D. E.; SCHÖTTLE, V. A.; NEMCOVA, P.; *et al.* Exploratory drive, fear, and anxiety are dissociable and independent components in foraging mice. *Translational Psychiatry*, v. 11, p. 318, 2021. DOI: 10.1038/s41398-021-01458-9.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, v. 6, n. 1, p. 39–51, 2013. DOI: 10.1177/1756283X12459294.

HERSON, M.; KULKARNI, J. Hormonal agents for the treatment of depression associated with the menopause. *Drugs & Aging*, v. 39, n. 8, p. 607–618, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40266-022-00962-x>.

HUTCHINSON, A. N. et al. The effects of oral probiotic intervention on brain structure and function in human adults: a systematic review. *npj Biofilms and Microbiomes*, v. 12, p. 6, 2026. DOI: 10.1038/s41522-025-00872-x.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. População cresce, mas

número de pessoas com menos de 30 anos cai 5,4% de 2012 a 2021. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua: envelhecimento populacional, 2022.

IQBAL, M. J.; KABEER, A.; ABBAS, Z. et al. Interplay of oxidative stress, cellular communication and signaling pathways in cancer. *Cell Communication and Signaling*, v. 22, art. 7, 2024.

JACKSON, M. J. Reactive oxygen species in sarcopenia: should we focus on excess oxidative damage or defective redox signalling? *Molecular Aspects of Medicine*, v. 50, p. 33–40, ago. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2016.05.002>.

JIANG, M. et al. Mechanisms of microbiota-gut-brain axis communication in anxiety disorders. *Frontiers in Neuroscience*, v. 18, p. 1501134, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1501134>.

KANDLUR, A.; SATYAMOORTHY, K.; GANGADHARAN, G. Oxidative stress in cognitive and epigenetic aging: a retrospective glance. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, v. 13, p. 41, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2020.00041>.

KAUR, H.; NAGAMOTO-COMBS, K.; GOLOVKO, S.; GOLOVKO, M. Y.; KLUG, M. G.; COMBS, C. K. Probiotics ameliorate intestinal pathophysiology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, v. 92, p. 114–134, 2020. DOI: [10.1016/j.neurobiolaging.2020.04.009](https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.04.009).

KEHM, R.; BALDENSPERGER, T.; RAUPBACH, J.; HÖHN, A. Protein oxidation: formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox Biology*, v. 42, p. 101901, 2021. DOI: [10.1016/j.redox.2021.101901](https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101901).

KEMPURAJ, D. et al. Mast cells in stress, pain, blood-brain barrier, neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 13, p. 54, 2019. DOI: [10.3389/fncel.2019.00054](https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00054).

İMSE, L. et al. A narrative review of psychobiotics: probiotics that influence the gut-brain axis. *Medicina (Kaunas)*, v. 60, n. 4, 601, 2024. DOI: [10.3390/medicina60040601](https://doi.org/10.3390/medicina60040601).

KLISIC, A.; AHMAD, R.; HADDAD, D.; BONOMINI, F.; SINDHU, S. Editorial: The role of oxidative stress in metabolic and inflammatory diseases. *Frontiers in Endocrinology*, v. 15, p. 1374584, 2024. DOI: [10.3389/fendo.2024.1374584](https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1374584).

KUIJER, E. J.; STEENBERGEN, L. The microbiota-gut-brain axis in hippocampus-dependent learning and memory: current state and future challenges. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 152, p. 105296, 2023. DOI: [10.1016/j.neubiorev.2023.105296](https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2023.105296).

LEE, M. C.; TU, Y. T.; LEE, C. C.; TSAI, S. C.; HSU, H. Y.; TSAI, T. Y.; LIU, T. H.; YOUNG, S. L.; LIN, J. S.; HUANG, C. C. *Lactobacillus plantarum* TWK10 improves muscle mass and functional performance in frail older adults: a randomized, double-blind clinical trial. *Microorganisms*, v. 9, n. 7, p. 1466, 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9071466.

LEFEVRE, J.; MCCLINTOCK, M. K. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biology of Reproduction*, v. 38, n. 4, p. 780–789, 1988.

LEJRI, I.; GRIMM, A.; ECKERT, A. Mitochondria, estrogen and female brain aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 10, p. 124, 2018. DOI: 10.3389/fnagi.2018.00124.

LI, Y.; TIAN, X.; LUO, J.; BAO, T.; WANG, S.; WU, X. Molecular mechanisms of aging and anti-aging strategies. *Cell Communication and Signaling*, Londres, v. 22, n. 1, p. 285, 2024. DOI: 10.1186/s12964-024-01663-1.

LIANG, G. et al. Menopause-associated depression and neuroinflammation. *Biomedicines*, v. 12, 2024.

LIU, X.; ZHAO, Y.; FENG, Y.; WANG, S.; ZHANG, J. Ovarian aging: mechanisms, age-related disorders, and therapeutic interventions. *MedComm (2020)*, v. 6, n. 12, e70481, 2025. DOI: 10.1002/mco2.70481.

LIU, Y.; GAO, J. *Reproductive aging: biological pathways and potential interventive strategies*. *Journal of Genetics and Genomics*, v. 50, n. 3, p. 141–150, 2023. DOI: 10.1016/j.jgg.2022.07.002.

LIZCANO, F.; GUZMÁN, G. *Estrogen deficiency and the origin of obesity during menopause*. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 757461, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/757461>.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. Hallmarks of aging: an expanding universe. *Cell*, v. 186, n. 2, p. 243–278, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.001>.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.

MALENKA, R. C.; BEAR, M. F. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, v. 44, n. 1, p. 5–21, 2004. DOI: 10.1016/j.neuron.2004.09.012.

MALUTAN, A.; DAN, M.; NICOLAE, C.; CARMEN, M. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokine changes related to menopause. *Menopause Review / Przegląd Menopauzalny*, v. 13, n. 3, p. 162–168, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5114/pm.2014.43818>.

MARANO, G. et al. Neuroinflammation and the female brain: sex-specific mechanisms underlying mood disorders and stress vulnerability. *Life (Basel)*, v. 16, n. 1, p. 139, 2026. DOI: <https://doi.org/10.3390/life16010139>.

MARANO, G. et al. Neuroinflammation and the female brain: sex-specific mechanisms underlying mood disorders and stress vulnerability. *Life (Basel)*, v. 16, n. 1, p. 139, 2026. DOI: <https://doi.org/10.3390/life16010139>.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. *Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations*. Brazilian Journal of Biology, v. 62, n. 4A, p. 609–614, 2002. DOI: 10.1590/S1519-69842002000400008.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, v. 47, p. 469–474, 1974. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.

MARTINO, C. et al. Microbiota succession throughout life from the cradle to the grave. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, n. 12, p. 707–720, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00768-z>.

MATTSON, M. P.; GLEICHMANN, M.; CHENG, A. Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron*, v. 60, n. 5, p. 748–766, 2008.

MCCALLION, A. et al. Estrogen mediates inflammatory role of mast cells in endometriosis pathophysiology. *Frontiers in Immunology*, v. 13, p. 961599, 2022. DOI: 10.3389/fimmu.2022.961599.

McCARTHY, M.; RAVAL, A. P. The peri-menopause in a woman's life: a systemic inflammatory phase that enables later neurodegenerative disease. *Journal of Neuroinflammation*, v. 17, n. 1, p. 317, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01998-9>.

MEHRABADI, S.; SADR, S. S. Assessment of probiotics mixture on memory function, inflammation markers, and oxidative stress in an Alzheimer's disease model of rats. *Iranian Biomedical Journal*, v. 24, n. 4, p. 220-228, 2020. DOI: 10.29252/ibj.24.4.220. Epub 29 fev. 2020.

MESQUITA, C. S.; OLIVEIRA, R.; BENTO, F.; GERALDO, D.; RODRIGUES, J. V.; MARCOS, J. C. Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for

quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical Biochemistry*, v. 458, p. 69–71, 2014. DOI: 10.1016/j.ab.2014.04.034.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 48, n. 4, p. 254–260, 1955. DOI: 10.1037/h0043788.

MORAIS, L. H.; SCHREIBER, H. L.; MAZMANIAN, S. K. O eixo microbiota intestinal-cérebro em distúrbios comportamentais e cerebrais. *Nature Reviews Microbiology*, v. 19, p. 241–255, 2021. DOI: 10.1038/s41579-020-00460-0.

MOTTAHEDIN, A.; ARDALAN, M.; CHUMAK, T.; RIEBE, I.; EK, J.; MALLARD, C. Effect of neuroinflammation on synaptic organization and function in the developing brain: implications for neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 11, p. 190, 2017. DOI: 10.3389/fncel.2017.00190.

NALAPAREDDY, K.; ZHENG, Y.; GEIGER, H. Aging of intestinal stem cells. *Stem Cell Reports*, v. 17, n. 4, p. 734–740, 2022. DOI: 10.1016/j.stemcr.2022.02.003.

NICOLA, A. C. et al. The transition to reproductive senescence is characterized by increase in A6 and AVPV neuron activity with attenuation of noradrenaline content. *Experimental Gerontology*, v. 81, p. 19–27, 1 ago. 2016. DOI: 10.1016/j.exger.2016.04.015.

NICOLA, A. C.; FERREIRA, L. B.; MATA, M. M.; VILHENA-FRANCO, T.; LEITE, C. M.; MARTINS, A. B.; et al. Vasopressinergic activity of the suprachiasmatic nucleus and mRNA expression of clock genes in the hypothalamus-pituitary-gonadal axis in female aging. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 652733, 2021. DOI: 10.3389/fendo.2021.652733.

NIETO, M. R.; RUS, M. J.; AREAL-QUECUTY, V.; et al. Menopausal shift on women's health and microbial niches. *npj Women's Health*, v. 3, p. 3, 2025. DOI: 10.1038/s44294-024-00050-y.

O'RIORDAN, K. J.; MOLONEY, G. M.; KEANE, L.; CLARKE, G.; CRYAN, J. F. The gut microbiota-immune-brain axis: therapeutic implications. *Cell Reports Medicine*, v. 6, n. 3, p. 101982, 2025. DOI: 10.1016/j.xcrm.2025.101982.

ODENWALD, M.; TURNER, J. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 14, p. 9–21, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2016.169>.

OKUMURA, R.; TAKEDA, K. O papel do sistema de barreira mucosa na manutenção da simbiose intestinal para prevenir a inflamação intestinal. *Seminars in Immunopathology*, v. 47, n. 2, 2025. DOI: 10.1007/s00281-024-01026-5.

PAL, S. et al. Emerging roles of mast cells in the regulation of lymphatic immunophysiology. *Frontiers in Immunology*, v. 11, p. 1234, 2020. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01234.

PALACIOS-FILARDO, J.; MELLOR, J. R. Neuromodulation of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, v. 54, p. 37–43, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.08.009>.

PARK, S. L.; KIM, M. S.; KIM, T. H. Gut microbiome and estrogen. *Journal of Menopausal Medicine*, v. 31, n. 2, p. 95–101, 2025. DOI: <https://doi.org/10.6118/jmm.24024>.

PETERS, B. A. et al. Menopause is associated with an altered gut microbiome and estrobolome, with implications for adverse cardiometabolic risk in the Hispanic Community Health Study/Study of Latinos. *mSystems*, v. 7, n. 3, e0027322, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/msystems.00273-22>.

PLAZA-DÍAZ, J.; RUIZ-OJEDA, F. J.; GIL-CAMPOS, M.; GIL, A. Mechanisms of action of probiotics. *Advances in Nutrition*, v. 10, suppl. 1, p. S49–S66, 2019. DOI: 10.1093/advances/nmy063. Erratum in: *Advances in Nutrition*, v. 11, n. 4, p. 1054, 2020.

PRAKASH, S.; RODES, L.; COUSSA-CHARLEY, M.; TOMARO-DUCHESNEAU, C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*, v. 5, p. 71–86, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2147/BTT.S19099>.

QIAN, Y. et al. Depression and anxiety in inflammatory bowel disease: mechanisms and emerging therapeutics targeting the microbiota-gut-brain axis. *Frontiers in Immunology*, v. 16, p. 1676160, 2025. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1676160.

QU, S. et al. *Gut microbiota modulates neurotransmitter and gut-brain signaling*. *Microbiological Research*, v. 287, p. 127858, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2024.127858>.

RODGERS, R. J.; DALVI, A. Anxiety, defense and the elevated plus-maze. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, v. 21, n. 6, p. 801–810, 1997. DOI: 10.1016/S0149-7634(96)00058-9.

RODRIGUES, V. S. T. et al. The model of litter size reduction induces long-term disruption of the gut-brain axis: an explanation for the hyperphagia of Wistar rats of both sexes. *Physiological Reports*, v. 10, n. 3, e15191, 2022. DOI: 10.14814/phy2.15191.

ROSS, K. Psychobiotics: are they the future intervention for managing depression and

anxiety? A literature review. *Explore (New York)*, v. 19, n. 5, p. 669-680, 2023. DOI:10.1016/j.explore.2023.02.007.

RUSCH, J. A.; LAYDEN, B. T.; DUGAS, L. R. Signalling cognition: the gut microbiota and hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Frontiers in Endocrinology*, v. 14, p. 1130689, 2023. DOI: 10.3389/fendo.2023.1130689.

SANTOS-MARCOS, J. A. et al. Interaction between gut microbiota and sex hormones and their relation to sexual dimorphism in metabolic diseases. *Biology of Sex Differences*, v. 14, n. 1, p. 4, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13293-023-00490-2>.

SCHARFMAN, H. E.; MACLUSKY, N. J. Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth factor interactions in the adult CNS. *Frontiers in Neuroendocrinology*, v. 27, n. 4, p. 415–435, 2006. DOI: 10.1016/j.yfrne.2006.09.004.

SEGÚ, H. et al. Intestinal morphometric changes induced by a Western-style diet in Wistar rats and GSPE counter-regulatory effect. *Nutrients*, v. 14, n. 13, 2608, 2022. DOI: 10.3390/nu14132608.

SHEPPARD, P. A. S. et al. *Structural plasticity of the hippocampus in response to estrogens in female rodents*. *Molecular Brain*, v. 12, n. 1, p. 1–17, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13041-019-0442-7>.

SIMONSON, M.; SIMONSON, T.; NOBÉCOURT, E. An overview of basic pathophysiological interactions between gut bacteria and their host. *Frontiers in Nutrition*, v. 12, p. 1565609, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2025.1565609>.

SINGH, P; PARAMANIK, V. Neuromodulating roles of estrogen and phytoestrogens in cognitive therapeutics through epigenetic modifications during aging. *Frontiers in Aging Neuroscience*, v. 14, n. 945076, p. 1 – 9, Aug. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.945076>.

SPIILJAR, M.; MERKLER, D.; TRAJKOVSKI, M. The immune system bridges the gut microbiota with systemic energy homeostasis: focus on TLRs, mucosal barrier, and SCFAs. *Frontiers in Immunology*, v. 8, p. 1353, 2017. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01353.

STRINGHETTA-GARCIA, C. T.; MORAIS, S. R. L.; FERNANDES, F.; PEREZ-UENO, M. J.; ALMEIDA, R. P.; et al. Effects of strength training and raloxifene on femoral neck metabolism and microarchitecture of aging female Wistar rats. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 14410, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-13098-5.

SUI, Y.; WU, J.; CHEN, J. The role of gut microbial β -glucuronidase in estrogen

reactivation and breast cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 9, p. 631552, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.631552>.

THEOHARIDES, T. C. The role of mast cells and their inflammatory mediators in immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 15, p. 12130, 2023. DOI: 10.3390/ijms241512130.

TIAN, T.; WANG, Z.; ZHANG, J. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, p. 4535194, 2017. DOI: 10.1155/2017/4535194.

TICINESI, A.; LAURETANI, F.; TANA, C.; NOUVENNE, A.; RIDOLO, E.; MESCHI, T.; MAGGIO, M. Gut microbiota, muscle mass and function in aging: a focus on physical frailty and sarcopenia. *Nutrients*, v. 11, n. 7, p. 1633, 2019. DOI: 10.3390/nu11071633.

TRAINA, G. Mast cells in gut and brain and their potential role as an emerging therapeutic target for neural diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 13, p. 345, 2019. DOI: 10.3389/fncel.2019.00345.

VALITUTTI, F. et al. Intestinal permeability, food antigens and the microbiome: a multifaceted perspective. *Frontiers in Allergy*, v. 5, p. 1505834, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/falgy.2024.1505834>.

VAN HUL, M. et al. What defines a healthy gut microbiome? *Gut*, v. 73, n. 11, p. 1893–1908, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2024-333378>.

VICENTINI, F. A. et al. Intestinal microbiota shapes gut physiology and regulates enteric neurons and glia. *Microbiome*, v. 9, n. 1, p. 210, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01165-z>.

WANG, H. et al. Gut microbiota has the potential to improve health of menopausal women by regulating estrogen. *Frontiers in Endocrinology*, v. 16, p. 1562332, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1562332>.

WANG, J. et al. Unravelling the intricate link: mast cells and estrogen-induced pain sensitization in endometriosis. *International Journal of Biological Sciences*, v. 21, n. 13, p. 5891-5904, 2025. DOI: 10.7150/ijbs.116635.

WANG, J.; HE, M.; YANG, M.; AI, X. Gut microbiota as a key regulator of intestinal mucosal immunity. *Life Sciences*, v. 345, p. 122612, 15 maio 2024. DOI: 10.1016/j.lfs.2024.122612.

WANG, W.; KANG, P. M. Oxidative stress and antioxidant treatments in cardiovascular diseases. *Antioxidants*, v. 9, n. 12, p. 1292, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.3390/antiox9121292>.

WARREN, A.; NYAVOR, Y.; ZARABIAN, N.; MAHONEY, A.; FRAME, L. A. The microbiota-gut-brain-immune interface in the pathogenesis of neuroinflammatory diseases: a narrative review of the emerging literature. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1365673, 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1365673.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, v. 77, p. 325–333, 1981. DOI: 10.1016/S0076-6879(81)77046-0.

XI, Y. Q.; WANG, Z. Q.; LI, G. J. et al. Association of inflammatory cytokines with cognitive function in first-episode major depressive disorder. *Frontiers in Psychiatry*, v. 15, p. 1473418, 2025. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2024.147341>.

XIE, X. et al. Study on gut microbiota and metabolomics in postmenopausal women. *BMC Women's Health*, v. 24, p. 608, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12905-024-03448-7>.

XU, Y.; HE, B. The gut-muscle axis: a comprehensive review of the interplay between physical activity and gut microbiota in the prevention and treatment of muscle wasting disorders. *Frontiers in Microbiology*, v. 16, p. 1695448, 2025.

YANG, K. et al. Distribution of gut microbiota across intestinal segments and their impact on human physiological and pathological processes. *Cell & Bioscience*, v. 15, n. 1, p. 47, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13578-025-01385-y>.

YU, X.; ZUO, Y.; YANG, Y.; et al. Mechanism of microbiota-gut-brain in perimenopausal depression: an inflammatory perspective. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 27, e28, 2025. DOI: 10.1017/erm.2025.10011.

ZHANG, L.; YAN, J.; ZHANG, C.; FENG, S.; ZHAN, Z.; BAO, Y.; ZHANG, S.; CHAO, G. Improving intestinal inflammaging to delay aging? A new perspective. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 214, p. 111841, 2023. DOI: 10.1016/j.mad.2023.111841.

ZHANG, M. Y. et al. Gut microbiota modulation in gastrointestinal disorders: current evidence and therapeutic perspectives. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 15, p. 1740322, 2026. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1740322>.

ZHOU, L.; WU, Q.; JIANG, L.; RAO, J.; GAO, J.; ZHAO, F.; WANG, X. Role of the microbiota in inflammation-related psychiatric disorders. *Frontiers in Immunology*, v. 16, p. 1613027, 2025. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1613027.

ANEXO A – Comitê de Ética



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Análise de parâmetros imunológicos e cerebrais de ratas Wistar adultas e senescentes após suplementação probiótica"**, Processo FOA nº 1028-2023, sob responsabilidade de Rita Cassia Menegati Dornelles apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 12 de Dezembro de 2023.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 28 de Dezembro de 2026.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 28 de Janeiro de 2027.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Analysis of immunological and efficiency parameters of adult and senescent Wistar rats after probiotic supplementation"**, Protocol FOA nº 1028-2023, under the supervision of Rita Cassia Menegati Dornelles presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 12, 2023.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 28, 2026.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 28, 2027.

Prof. Dr. Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br