



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

LUANA GALANTE DOURADINHO

**ADAPTAÇÃO REDOX E PROTEÇÃO FUNCIONAL
INDUZIDOS PELO TREINAMENTO AERÓBIO EM
RESPOSTA À NEUROTOXICIDADE DO ÁCIDO IBOTÊNICO
EM RATAS SENIS**

ARAÇATUBA

2026

LUANA GALANTE DOURADINHO

**ADAPTAÇÃO REDOX E PROTEÇÃO FUNCIONAL
INDUZIDOS PELO TREINAMENTO AERÓBIO EM
RESPOSTA À NEUROTOXICIDADE DO ÁCIDO IBOTÊNICO
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

D739a Douradinho, Luana Galante.
Adaptação redox e proteção funcional induzidos pelo
treinamento aeróbio em resposta à neurotoxicidade do
ácido ibotênico em ratas senis / Luana Galante Doura-
dinho. - Araçatuba, 2026
65 f. : il. ; tab.

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

1. Envelhecimento 2. Treino aeróbico 3. Dano oxidativo
4. Hipocampo 5. Núcleo basal de Meynert I. T.

CDD 612

FOLHA DE APROVAÇÃO

Luana Galante Douradinho

Adaptação redox e proteção funcional induzidos pelo treinamento aeróbio em resposta à neurotoxicidade do ácido ibotênico 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.

Aprovado em: 27/05/2026

Banca Examinadora

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

Instituição: Universidade Estadual Paulista-UNESP

Prof. Dr. **Diogo Antonio Alves de Vasconcelos**

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. **Hindiael Aeraf Belchior**

Instituição: Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 26.12.2000, Penápolis – SP.

Filiação: Érica de Fátima Galante Douradinho
Manoel Lopes Douradinho

2019/2023: Curso de Graduação em Fisioterapia Bacharelado pela Universidade UNITOLEDIO wyden, Araçatuba – SP.

2019/2023: Iniciação científica no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Envelhecimento Feminino– UNESP (FOA) – 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 ser a base de tudo em minha vida. Sem a Sua presença, nada disso seria possível. A Ele, toda honra e glória por ter me sustentado ao longo dessa caminhada, por estar presente em cada oração e por me conceder força e sabedoria para superar todos os desafios. Sou profundamente grata por nunca ter me desamparado e por sempre ouvir minhas súplicas.

Aos meus pais, Érica de Fátima Galante Douradinho e Manoel Lopes Douradinho, por serem minha base e meu maior alicerce. Sempre me ofereceram tudo o que eu precisava: amor, apoio e incentivo. Estiveram ao meu lado em todos os momentos, sem questionar, acreditando em mim mesmo quando os caminhos pareciam difíceis. Sou profundamente grata por todo o esforço dedicado à minha formação, por sempre valorizarem a educação e por nunca deixarem de me amar. Esta conquista também é de vocês.

Ao meu namorado, meu melhor amigo e companheiro de todas as horas Quemuel Vitoreli. Obrigada por estar ao meu lado em cada etapa dessa caminhada, pelo apoio constante, pelo incentivo nos momentos mais difíceis e por nunca me deixar desistir. Sua presença, cuidado e dedicação foram essenciais, inclusive nos momentos em que estive comigo presencialmente para me ajudar. Essa conquista também carrega um pouco de você, porque em cada passo meu, você esteve junto.

À minha avó, Edna Galante, que é um verdadeiro anjo em minha vida. Seu exemplo de amor, compaixão e entrega ao próximo sempre foi uma inspiração para mim. Sua bondade, seu amor incondicional e sua capacidade de se doar ao próximo são exemplos que levo comigo todos os dias. Obrigada por cada gesto de carinho, por cada palavra de incentivo e, principalmente, por sempre me lembrar, com tanto orgulho, do meu valor.

Ao meu avô, Silvio Galante que partiu durante esta jornada, mas permanece vivo em meu coração e em tudo o que sou. Sei que não poderá acompanhar esta conquista daqui da Terra, mas tenho a certeza de que, do céu, olha por mim com

orgulho. Sua história, seus valores e seu exemplo foram fundamentais na minha trajetória e, inclusive, serviram de inspiração para a construção deste trabalho. Levo comigo sua memória com amor, gratidão e saudade eterna.

Às minhas tias, Glaucia Galante e Silvana Galante por todo o amor, carinho e presença constante em minha vida. Sempre estiveram ao meu lado, me apoiando, incentivando e torcendo por mim em cada etapa dessa caminhada. Sou profundamente grata por todo o cuidado e por fazerem parte da minha trajetória de forma tão especial.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Diretor da FOA / UNESP, Prof^a. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem e ao Vice-Diretor Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra pelo apoio.

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

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

Aos Professores do Departamento de Ciências Básicas da FOA-UNESP, pela ajuda, colaboração e aprendizado durante esta jornada.

Aos discentes e egressos do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela amizade e companheirismo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos os funcionários da UNESP. Muito obrigado a todos!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha família, por sempre acreditarem em mim, por estarem presente e me proporcionarem tanto amor e carinho. Muito obrigada!

À minha orientadora, Profa. Dra. Rita Cássia Menegati Dornelles, por me fazer acreditar em mim, me dar todo suporte necessário para finalizar esta etapa da minha vida e me deixar apaixonada por nossa área de pesquisa. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto, por toda ajuda necessária, ensinamentos e conversas. Se fez muito importante nesse longo caminho. Muito obrigada!

À minha melhor amiga, minha irmã de alma, Débora Prazias Cavalcante, não existem palavras suficientes para expressar o quanto você foi essencial em toda essa jornada. Foi você quem me incentivou a dar esse passo e, desde então, estive ao meu lado em absolutamente todos os momentos nos dias leves e nos mais difíceis, nas risadas e nas lágrimas. Obrigada por nunca soltar a minha mão, por cuidar de mim, por acreditar em mim quando eu mesma duvidei e por celebrar cada uma das minhas conquistas como se fossem suas. Essa vitória é nossa. Muito obrigada!

À minha amiga, Thainá Daguane Esperança por toda parceria, apoio e dedicação ao longo dessa jornada. Sua presença foi fundamental em cada etapa desse processo, sempre disposta a ajudar, compartilhar conhecimentos e tornar os desafios mais leves. Sou muito grata por todo o suporte, pela paciência e por caminhar ao meu lado durante essa trajetória. Muito obrigada!

À minha prima, Julia Zanuto Douradinho por estar presente e compartilhar comigo essa jornada. Sou grata pelo apoio, pela parceria, pelas risadas e por fazer parte desse caminho ao meu lado. Muito obrigada!

Aos meus colegas de departamento, Mariana Santana Quirino da Silva, Lucas Henrique Francisco Custódio, Brenda Renata Lopes Justo, Beatriz Travalon Fabrício,

Thales Polizel Guidotti Ribeiro por tornarem essa jornada mais leve e especial. Com vocês aprendi que a ciência pode ser construída com generosidade, sem competição e com verdadeiro espírito de companheirismo. Muito obrigada!

Aos integrantes do LaFEE e do Departamento de Ciências Básicas, por toda parceria e colaboração durante esses anos. Muito obrigada!

“A criatividade é a inteligência se divertindo”

Albert Einstein

RESUMO

O envelhecimento e a senescência reprodutiva estão associados ao aumento do estresse oxidativo e à vulnerabilidade neurodegenerativa. Este estudo investigou se o treinamento aeróbio (TA) prévio atenua a neurotoxicidade induzida pelo ácido ibotênico (IBO) no núcleo basal de Meynert (NBM) de ratas Wistar senis. Ratas fêmeas (21–25 meses) foram distribuídas aleatoriamente nos grupos: não treinadas/NaCl, não treinadas/IBO, TA/NaCl e TA/IBO. O TA foi realizado em esteira, com intensidade moderada, por 120 dias antes da infusão de NaCl ou IBO (1,0 μ L, infusão de 0,1 μ L/min) no NBM. As ratas incluídas no estudo foram submetidas ao teste de velocidade incremental de velocidade máxima (TIVM) para análise do desempenho motor. O estado redox foi analisado no plasma e no hipocampo por meio da avaliação da capacidade antioxidante total (TAC), glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx) e oxidação de lipídios e proteínas. Os resultados revelaram predominância do efeito do TA sobre praticamente todos os marcadores hipocampus avaliados, com tamanhos de efeito elevados (η^2_p frequentemente $> 0,70$). No hipocampo, as ratas treinadas apresentaram redução na carbonilação de proteínas e na peroxidação lipídica, acompanhada por maior TAC, indicando melhora nas defesas antioxidantes. As ratas não treinadas (NT) expostas ao IBO apresentaram aumento na TAC e GSH, consistente com resposta compensatória transitória ao estresse oxidativo excitotóxico. As ratas treinadas exibiram níveis reduzidos de SOD e GPx, sugerindo utilização eficiente de antioxidantes e adaptação redox. Nenhuma alteração plasmática significativa foi detectada, provavelmente devido à compartimentalização das respostas oxidativas dentro do sistema nervoso central. As ratas do grupo TA-IBO apresentaram redução significativa na atividade da acetilcolinesterase no hipocampo quando comparado ao grupo NT-IBO. Na análise histológica da região CA1 do hipocampo foi observado aumento no número de células Nissl-positivas no grupo TA-NaCl em relação ao NT-NaCl. O IBO reduziu o número de neurônios positivos para Nissl, com diferença significativa entre TA-IBO e TA-NaCl. Na região CA3, o grupo NT-IBO apresentou redução no número de neurônios Nissl-positivos em relação ao NT-NaCl, entretanto, os animais do grupo TA-IBO apresentaram maior número de células Nissl-positivas em relação aos NT-IBO. Apesar da exposição ao IBO, as ratas treinadas mantiveram desempenho motor superior em comparação com as ratas não treinadas. De forma geral, os resultados demonstraram que o TA promoveu importante adaptação redox no hipocampo, reduziu marcadores de dano oxidativo, modulou a atividade colinérgica e favoreceu a preservação neuronal frente ao insulto excitotóxico induzido pelo IBO. Esses achados reforçam a ação do treinamento aeróbio como estratégia de pré-condicionamento neuroprotetor durante a senescência.

Palavras-chave: Envelhecimento; Treino aeróbico; Dano Oxidativo; Hipocampo; Núcleo basal de Meynert.

ABSTRACT

Aging and reproductive senescence are associated with increased oxidative stress and neurodegenerative vulnerability. This study investigated whether prior aerobic training (AT) attenuates ibotenic acid (IBO)-induced neurotoxicity in the nucleus basalis of Meynert (NBM) of senile Wistar rats. Female rats (20–25 months) were randomly assigned to the following groups: untrained/NaCl, untrained/IBO, AT/NaCl, and AT/IBO. AT was performed on a treadmill at moderate intensity for 120 days prior to infusion of NaCl or IBO (1.0 μ L, 0.1 μ L/min infusion) into the NBM. Rats included in the study underwent the incremental speed test of maximum velocity (IVMT) for motor performance analysis. The redox state was analyzed in plasma and hippocampus by evaluating total antioxidant capacity (TAC), reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), and lipid and protein oxidation. The results revealed a predominance of the TA effect on virtually all hippocampal markers evaluated, with high effect sizes (η^2p frequently > 0.70). In the hippocampus, trained rats showed a reduction in protein carbonylation and lipid peroxidation, accompanied by higher TAC, indicating improved antioxidant defenses. Untrained (NT) rats exposed to IBO showed an increase in TAC and GSH, consistent with a transient compensatory response to excitotoxic oxidative stress. Trained rats exhibited reduced levels of SOD and GPx, suggesting efficient use of antioxidants and redox adaptation. No significant plasma alterations were detected, likely due to the compartmentalization of oxidative responses within the central nervous system. Female rats in the TA-IBO group showed a significant reduction in acetylcholinesterase activity in the hippocampus compared to the NT-IBO group. Histological analysis of the CA1 region of the hippocampus showed an increase in the number of Nissl-positive cells in the TA-NaCl group compared to the NT-NaCl group. IBO reduced the number of Nissl-positive neurons, with a significant difference between TA-IBO and TA-NaCl. In the CA3 region, the NT-IBO group showed a reduction in the number of Nissl-positive neurons compared to the NT-NaCl group; however, animals in the TA-IBO group showed a higher number of Nissl-positive cells compared to the NT-IBO group. Despite exposure to IBO, trained rats maintained superior motor performance compared to untrained rats. Overall, the results demonstrated that aerobic training promoted significant redox adaptation in the hippocampus, reduced markers of oxidative damage, modulated cholinergic activity, and favored neuronal preservation in the face of excitotoxic insult induced by IBO. These findings reinforce the role of aerobic training as a neuroprotective preconditioning strategy during senescence.

Keywords: Aging; Aerobic Training; Oxidative Damage; Hippocampus; Basal Nucleus of Meynert.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação simplificada da função do estrogênio no cérebro	20
Figura 2 – Representação simplificada da proteólise da APP	22
Figura 3 – Processo da Hiperfosforilação da Tau	22
Figura 4 – Representação da posição dos neurônios colinérgicos no SNC em roedores	25
Figura 5 – Delineamento experimental	34
Figura 6 – Ciclo estral	35
Figura 7 – Teste incremental de velocidade máxima	37
Figura 8 – TIVM das ratas do grupo TA após cirurgia estereotáxica	38
Figura 9 – Dano oxidativo proteico	39
Figura 10 – Dano oxidativo lipídico	40
Figura 11 – Defesa antioxidante não-enzimática (TAC)	41
Figura 12 – Defesa antioxidante não-enzimática (GSH)	42
Figura 13 – Defesa antioxidante enzimática (SOD)	43
Figura 14 – Defesa antioxidante enzimática (GPx)	44
Figura 15 – Defesa antioxidante enzimática (CAT)	45
Figura 16 – Determinação da atividade da enzima AchE	46
Figura 17 – Análise Histológica por coloração de Nissl	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Massa corporal, uterina e ovariana inicial e final de ratas Wistar NT e TA 36

LISTA DE SIGLAS

α – Alfa

Ach – Acetilcolina

AchE – Acetilcolinesterase

AP – Anteroposterior

APP – Proteína precursora amilóide

ATCI – Iodeto de acetiltiocolina

A β – Peptídio β -amilóide

B – Beta

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BFCNs – Neurônios Colinérgicos Basais

BHE – Barreira Hematoencefálica

CAT – Catalase

Ca²⁺⁺ Cálcio

D – Diestro

DA – Doença de Alzheimer

DV – Dorsoventral

DNPH – Dinitrofenilhidrazina

DTNB – Ácido 2-nitrobenzóico

DTPA – Ácido dietilenotriaminopentaacético

E – Estro

EA – Exercício Aeróbio

EF – Exercício Físico

EO – Estresse oxidativo

EPM – Erro padrão da média

EROs – Espécies reativas de oxigênio

E₂ – Estradiol

FRAP – *Ferric reducing antioxidant power*

g – Gramas

GPx – Glutational peroxidase

GR – Glutational reductase

GSH – Glutational

GSSG – GSH oxidado

h – Hora

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IBO – Ácido Ibotênico

M – Metaestro

mL – mililitro

ML – Mediolateral

mM – miliMol

min – Minutos

mg – Miligramas

mol/L – Mol por litro

mmol/L – milimols por litro

MDA – Malondialdeído

NaOH – Hidróxido de sódio

nAChR – Receptores nicotínicos

mAChR – Receptores muscarínicos

NBM – Núcleo Basal de Meynert

NFTs – Emaranhados neurofibrilares intracelulares

NGF – Fator de crescimento nervoso

nm – Nanômetro

NT – Não treinadas

O₂ – Oxigênio

P – Proestro

p – Nível descritivo ou probabilidade de significância

PC – Proteína carbonilada

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonila

PT – Proteína total

SNC – Sistema nervoso central

SOD - Superóxido dismutase

STRAW – *Stages of Reproductive Aging Workshop*

TA – Treinamento aeróbio

TAC – Capacidade antioxidante total

TBARs – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – Ácido tricloroacético

tGSH – GSH reduzido + GSSG oxidado

TIVM – Teste incremental de velocidade máxima

μL – Microlitros

μmol – Micro mol

μmol/L – Micro mol por litro

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE SIGLAS	16
1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Determinação dos grupos de trabalho e critério de inclusão.....	29
3.3 Delineamento experimental.....	29
3.4 Protocolo do treinamento aeróbio (TA)	30
3.5 Modelo de Neurotoxicidade Induzida por IBO	30
3.6 Coleta do material biológico	31
3.7 Análise de Estresse Oxidativo.....	31
3.7.1 Preparação do Homogenato	31
3.7.2 Determinação de proteína carbonilada e dano oxidativo lipídico	32
3.7.3 Determinação da defesa antioxidante não-enzimática	32
3.7.4 Determinação da defesa antioxidante enzimática	33
3.8 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	33
3.9 Eutanásia por perfusão transcardíaca.....	34
3.9.1 Análise Histológica com cresil violeta.....	34
3.10 Análise Estatística.....	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Parâmetros Gerais.....	36
4.2 Treinamento Aeróbio	37

4.3 Estresse Oxidativo	39
4.3.1 Dano oxidativo proteico após a realização do TA.....	39
4.3.2 Dano oxidativo lipídico após a realização do TA.....	40
4.3.3 Defesa antioxidante não enzimática após a realização do TA.....	41
4.3.4 Defesa Antioxidante Enzimática.....	43
4.4. Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	46
4.5. Análise Histológica dos corpúsculos de Nissl.....	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO A – Comitê de Ética.....	65

1 INTRODUÇÃO

O sistema reprodutor feminino está entre os primeiros sistemas orgânicos humanos a envelhecer, ocasionando consequências cruciais para saúde feminina (Balough et al., 2024). O Workshop de Estágios do Envelhecimento Reprodutivo (STRAW) propôs que o envelhecimento feminino pode ser caracterizado por três fases: fase reprodutiva, fase de transição da menopausa e fase pós-menopausa (Harlow et al., 2012). A perimenopausa é o estágio de transição do ciclo reprodutivo para o não reprodutivo, este período ocorre em estágios caracterizados por propriedades endócrinas únicas que podem impactar no funcionamento de múltiplos sistemas orgânicos, incluindo o encéfalo (Troia et al., 2025; Mosconi et al., 2021).

Sob a perspectiva endócrina, a perimenopausa é marcada por maior irregularidade tanto na duração dos ciclos menstruais quanto nas concentrações de hormônios circulantes (Harlow et al., 2012). Nesse período, a ovulação torna-se irregular em decorrência das oscilações nos hormônios produzidos pelo eixo hipotálamo-hipófise-ovário. Como consequência, as concentrações de estrogênio caracterizam-se por acentuada variabilidade e ausência de padrão previsível, entretanto, após esse período de transição menopausal, ocorre a estabilização das concentrações em valores persistentemente reduzidos (Brinton et al., 2015). Os efeitos do estrogênio no sistema nervoso central (SNC) envolvem processos complexos, uma vez que esse hormônio modula múltiplos mecanismos biológicos, incluindo o metabolismo energético, a plasticidade sináptica e a função mitocondrial (Briceno Silva et al., 2024), representados na figura1.

Representação simplificada da função do estrogênio no encéfalo

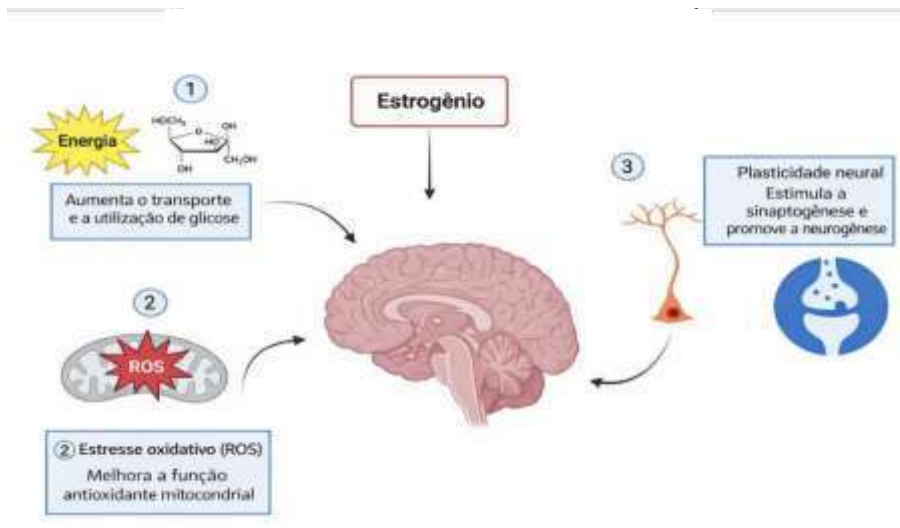


Figura 1. Representação simplificada da função do estrogênio no encéfalo. 1) O estrogênio aumenta o transporte e a utilização da glicose no cérebro. 2) O estrogênio melhora a função antioxidante mitocondrial. 3) O estrogênio tem efeitos neuroprotetores no encéfalo, estimulando a neurogênese e a sinaptogênese [Adaptado de Briceno Silva et al., 2024].

Muitos sintomas observados na perimenopausa são atribuídos à menopausa, entretanto, são típicos desse período imediatamente anterior e podem comprometer severamente a qualidade de vida das mulheres de meia idade (Cunningham et al., 2025). Com isso, perimenopausa é considerada estado de “transição neurológica”, já que muitos sintomas da menopausa são de natureza neurológica, como ondas de calor, sono perturbado, alterações de humor, alterações cognitivas e de memória, essas manifestações clínicas observadas nesse período estão diretamente ligadas às variações hormonais, com destaque para a redução da concentração de estrogênio (Mosconi et al., 2021). Esse cenário pode ser agravado por aspectos como idade, condições socioeconômicas e a presença de doenças prévias, o que reforça a importância de abordagem terapêutica individualizada. Dessa forma, o controle desses sintomas geralmente envolve a adoção de estratégias relacionadas ao estilo de vida, incluindo mudanças nos hábitos alimentares e a prática regular de atividade física (Dos Santos Silva et al., 2024). A transição da menopausa foi postulada como fator contribuinte para a vulnerabilidade feminina associada à patogênese da doença de Alzheimer (DA), devido a redução da capacidade neuroprotetora do estradiol (E₂), resultando na interrupção de vários sistemas cerebrais (Breeze et al., 2024).

A DA é condição multifatorial caracterizada por neurodegeneração gradual e progressiva causada pela morte de células neuronais, o fator mais significativo para essa doença é a idade, sendo que pessoas com 65 anos ou mais apresentam maior risco de demência por Alzheimer, além disso, as mulheres representam dois terços de todos os casos de DA (Alzheimer's Association, 2025). A DA é caracterizada por duas características patológicas: placas extracelulares, constituídas principalmente pelo peptídeo β -amiloide (A β), e emaranhados neurofibrilares intracelulares (NFTs), compostos por TAU hiperfosforilado (Figuras 2 e 3) (Salta et al., 2023), resultando na perda de sinapses e atrofia neuronal predominantemente em todo o hipocampo e córtex cerebral. Os principais sintomas da DA envolvem deterioração progressiva da memória, associada com distúrbios emocionais como depressão e ansiedade, que estão intimamente correlacionados com a degeneração e disfunção dos neurônios no hipocampo (Cao et al., 2024).

Pesquisas correlacionam a neurotoxidade da A β com o surgimento do estresse oxidativo. Experimentos *in vitro* demonstraram que esse peptídeo aumentou as concentrações de peróxido de hidrogênio e lipídicos, promovendo não só o aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) bem como, redução da remoção dos mesmos, induzindo a falha no potencial mitocondrial vicioso (Tamagno et al., 2021; Zhao e Zhao, 2013). Esses autores verificaram que o estresse oxidativo reduziu a função da enzima α -secretase e aumentou atividade da β -secretase e γ -secretase, gerando circuito vicioso. O encéfalo utiliza cerca de 20% de oxigênio a mais que outros órgãos, se tornando mais suscetível a esse tipo de estresse, devido ao aumento de EROs e ERNs alterarem a permeabilidade da barreira hematoencefálica, diminuindo a sinalização sináptica, progredindo a perda neuronal e auxiliando no comprometimento cognitivo leve, déficits de memória, principalmente no hipocampo e córtex (Sharma et al., 2021; Twarowski et al., 2023; Cuestas Torres & Cardenas, 2020).

Representação simplificada da proteólise da APP

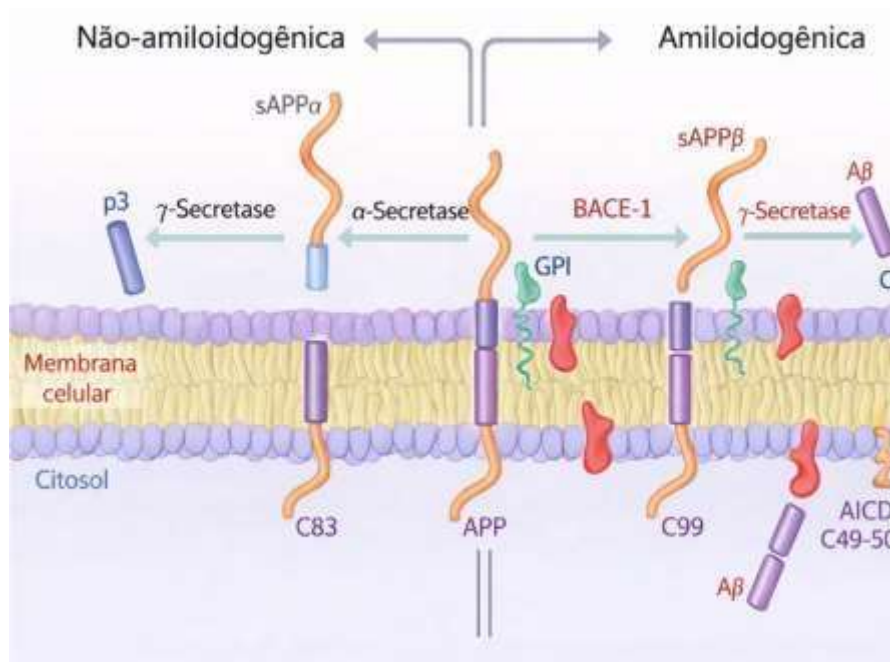


Figura 2. Representação simplificada da proteólise da proteína precursora amilóide (APP). A) Via não-amiloidogênica. B) Via amiloidogênica [Adaptado de Querfurth, 2010].

Processo da Hiperfosforilação da Tau

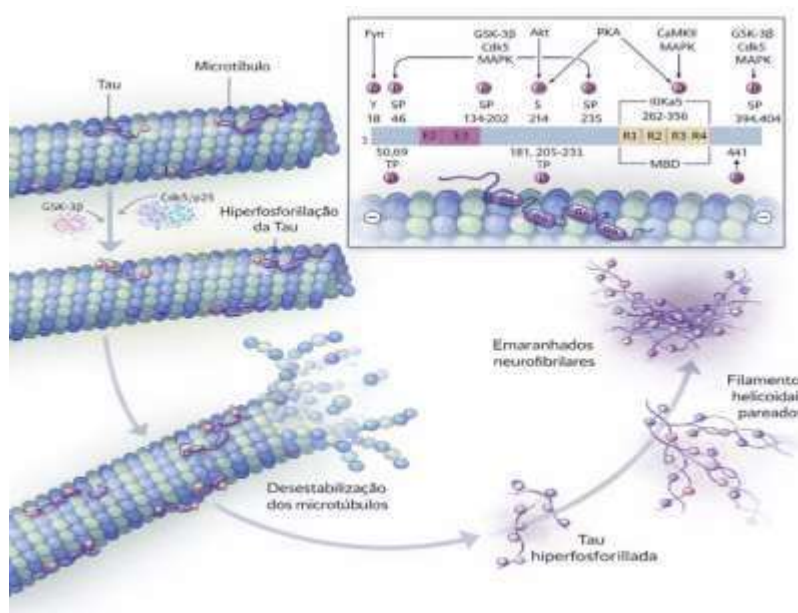


Figura 3. Processo de hiperfosforilação da tau [Adaptado de Querfurth, 2010].

Sabe-se que a transição da perimenopausa para menopausa está associada com o surgimento da DA, uma vez que E₂ influencia o processamento da proteína precursora de amiloide (APP), diminuindo a produção de peptídeos A β ao favorecer vias não amiloidogênicas, além do mais, ele atua nas mitocôndrias aumentando a produção de ATP em neurônios saudáveis do hipocampo, mantendo essa produção mesmo após a instalação da A β , associado a isso, foi relatado que este hormônio induz a desfosforilação da Tau (Villaseca et al., 2022; Rettberg et al., 2014). Durante o processo de transição, os sistemas de proteção são diminuídos, levando ao acúmulo de placas A β neurotóxicas, alterando a função sináptica, promovendo respostas inflamatórias, contribuindo para a morte neuronal e corroborando para a progressão da DA (Breeze et al., 2024). Além disso, E₂ interage com as funções colinérgicas, dopaminérgicas e mitocondriais, que parecem preceder a patologia de placas A β e NFTs (Mufson et al., 2015).

Artigo recente relata que o E₂ está sendo considerado regulador chave da atividade neuronal colinérgica, estando o sistema colinérgico no prosencéfalo basal dependente da atividade do estrogênio para a manutenção de sua função (Dumas et al., 2026). Adicionalmente, evidências indicam que o E₂ exógeno é capaz de modular o tônus colinérgico tanto em humano quanto em animais, exercendo efeito neuroprotetor frente ao declínio cognitivo associado à redução dos hormônios

ovarianos durante a menopausa (Conley et al., 2024).

No processo de senescência a neurotransmissão da acetilcolina (ACh) declina, resultando na hipofunção colinérgica, essa redução juntamente com atrofia grave do sistema colinérgico do prosencéfalo basal, especialmente do núcleo basal de Meynert (NBM), são consideradas parte da cascata fisiopatológica na DA, pois são vulneráveis ao acúmulo de A β e NFTs (Kuhn et al., 2015; Kilimann et al., 2014; Sabandal et al., 2022). O NBM compreende neurônios colinérgicos do grupo Ch4 e constitui cerca de 90% dos neurônios colinérgicos, está localizado dentro de faixa contínua de estruturas, incluindo a amígdala, hipocampo e o córtex entorrinal, regiões com alto risco de degeneração na patologia da DA, indicando que o posicionamento anatômico do NBM seria a principal razão para sua vulnerabilidade aos NFTs (Fig 4) (Shafiee et al., 2024). O NBM está envolvido principalmente com atenção, memória, plasticidade motora, excitação e percepção (Oswal et al., 2021; Rogozinski et al., 2022), além do mais, evidências sugerem que a perda neuronal desse núcleo possa ser um dos primeiros marcos de neurodegeneração na DA, auxiliando com o comprometimento cognitivo, apresentando disfunção sináptica e alterações na mielinização, devido suas extensas projeções serem suscetíveis à patologia (Nemy et al., 2023).

Em pacientes com DA observa-se neurodegeneração acentuada acompanhada de perda significativa de neurônios colinérgicos e redução da atividade da acetilcolinesterase (AChE), comprometendo a neurotransmissão colinérgica. Além de sua função clássica na degradação da ACh, evidências indicam que a AChE pode interagir diretamente com a presenilina-1, enzima importante no processo de clivagem da APP, favorecendo o aumento na produção de A β , aumentando assim as concentrações de A β , acelerando a disfunção cognitiva, além disso, alterações colinérgicas podem corroborar para fosforilação anormal da proteína tau e inflamação de células nervosas (Chen et al., 2022). Nesse contexto, o comprometimento do sistema colinérgico, composto por receptores nicotínicos (nAChR) e muscarínicos (mAChR), essenciais para memória e aprendizagem torna-se ainda mais relevante. Interações do receptor $\alpha 7$ nAChR e A β , classificaram esse receptor como um receptor de A β , no qual, em condições fisiológicas o A β secretado durante a atividade sináptica eleva liberação de neurotransmissores mediados por esse receptor nicotínico, contudo, em condições patológicas como o acúmulo exacerbado de peptídeos A β leva à inibição e internalização desse receptor, reduzindo a sinalização colinérgica e desencadeando disfunção sináptica (Peñalva et al., 2025).

Representação da posição dos neurônios colinérgicos no SNC em roedores

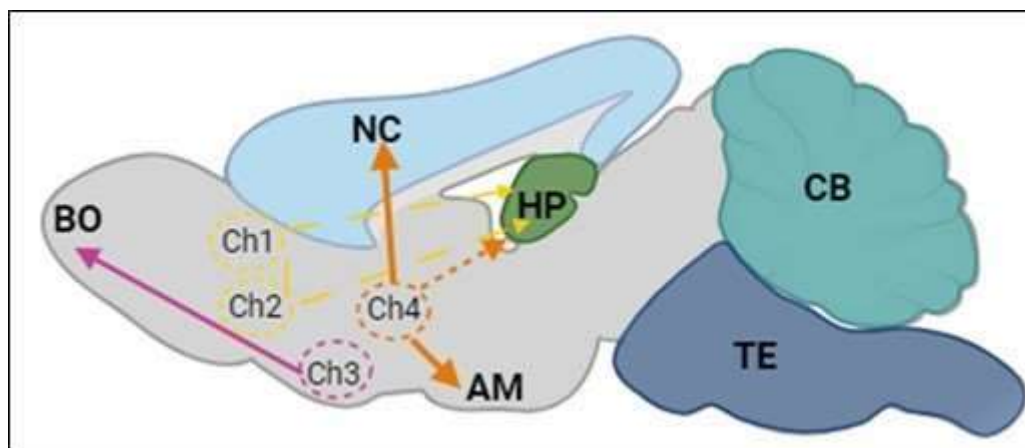


Figura 4. Representação da posição dos neurônios colinérgicos no SNC em roedores. Neurônios Ch1 estão localizados no septo medial, Ch2 e Ch3 estão na extremidade vertical e horizontal da área de Broca, respectivamente. Neurônios Ch4 estão no Núcleo Basal de Meynert. Os neurônios Ch1-Ch4 ficam situados no prosencéfalo basal. Abreviações: BO- bulbo olfatório, AM- amígdala, NC- neocórtex, HP-hipocampo, TE- tronco encefálico e CB- cerebelo. [Adaptado de Castro, 2009].

A preservação do fenótipo dos neurônios colinérgicos basais (BFCNs) depende fortemente do suporte trófico exercido pelo fator de crescimento nervoso (NGF) endógeno, secretado pelos neurônios piramidais. Além do NGF, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) também desempenha função fundamental no suporte aos BFCNs e na manutenção do fenótipo dos neurônios piramidais, além disso, o BDNF exerce função fundamental nas fases inicial e tardia da potenciação de longo prazo e está intensamente envolvido nos processos de aprendizagem e memória (Orciani et al., 2022). A diminuição do BDNF e do NGF, acarreta hipotrofia dos neurônios colinérgicos, uma vez que esses fatores colaboram para a recuperação desses neurônios em degeneração no prosencéfalo basal, aumentando a secreção de Ach, além disso, o exercício aumenta a expressão do BDNF e NGF no hipocampo e prosencéfalo basal (Hall e Savage, 2016).

O estilo de vida pode contribuir ou prejudicar o diagnóstico e prognóstico da DA (de La Rosa et al., 2020), sabe-se que a inatividade física é fator de risco para a doença, auxiliando o declínio cognitivo no período de senescência, aumentando as taxas de mortalidade e comorbidade. Entretanto, o exercício físico (EF) apresenta efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, ampliando a capacidade de neurônios resistirem ao estresse oxidativo, uma vez que, os oligômeros A β presentes no cérebro com DA também podem promover a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que danificam ainda mais os neurônios e comprometem as funções cognitivas (Duzel

et al., 2016; Hernández-Álvarez et al., 2023; Dhapola et al., 2024). Também foi relatado que o EF é capaz de melhorar o suprimento sanguíneo cerebral, fornecendo mais oxigênio (O₂) e substratos energéticos, sugerindo que EF desencadeia efeitos protetores contra as doenças neurodegenerativas (Dare et al., 2020).

Somando a isso, foi demonstrado que o exercício aeróbico (EA) atenua a redução das fibras colinérgicas relacionadas à senescência, concomitantemente, diminui a perda de fibras colinérgicas no hipocampo e malformação das mesmas no prosencéfalo basal (Zong et al., 2022). O aumento da capacidade cardiorrespiratória, com EA, reduziu a atrofia cerebral juntamente com atenuação da neurotoxicidade, formação das placas Aβ (Morris et al., 2017) e hiperfosforilação da tau, protegendo a unidade neurovascular e degradações proteolíticas (de La Rosa et al., 2020; Vecchio et al., 2018). Duzel e colaboradores (2016) verificaram que o EA aumentou a síntese de BDNF, a plasticidade sináptica e a quantidade de espinhas dendríticas na região de CA1, giro denteado e córtex entorrinal. Associado a isso, foi evidenciado que a corrida previniu a morte neuronal, intensificando a diferenciação dos neurônios, produzindo menos citocinas inflamatórias no hipocampo, podendo reverter o declínio da neurogênese e perda de memória (Opendak e Gould, 2015), melhorando a memória espacial, atenção e velocidade de processamento (Zhang et al., 2022; Mitsushima et al., 2009).

Embora atualmente não exista modelo animal concreto que represente toda a sintomatologia e patologia da DA, lesões no NBM com ácido ibotênico (IBO) são utilizados como modelo adequado para a doença, pois os modelos animais apresentam alterações patológicas, bioquímicas e comportamentais semelhantes à DA (Hosseini et al., 2017). O IBO é agonista do receptor NMDA que quando injetado no cérebro de modelos animais ocasionam lesões graves, induzindo o influxo exacerbado de cálcio (Ca²⁺) e, por ser neurotoxina, exacerba os sintomas semelhantes à DA (Karthick et al., 2016).

Portanto, a hipótese do presente estudo é que o treinamento aeróbico prévio induz adaptações redox no hipocampo, reduz o dano oxidativo e promove maior resistência à integridade neuronal frente à neurotoxicidade induzida pelo ácido ibotênico em ratas senis.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar se a realização prévia de treinamento aeróbio minimiza à neurotoxicidade induzida pelo IBO no NBM de ratas Wistar no período do envelhecimento reprodutivo.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar dano oxidativo proteico e lipídico, defesa antioxidante enzimática e não-enzimática, após realização do treinamento aeróbio (TA), no hipocampo e plasma de ratas na periestrofa;
- Avaliar a atividade da acetilcolinesterase no hipocampo de ratas com 25 meses de idade, após o TA, investigando possíveis alterações associadas ao envelhecimento.
- Avaliar os possíveis efeitos preventivos da prática do TA após a injeção de IBO no NBM de ratas Wistar no período da senescência reprodutiva, sobre a histologia no tecido hipocampal.

3 METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os Princípios de Cuidados com Animais de Laboratório e as diretrizes do Comitê Institucional de Uso e Cuidado Animal, visando minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais utilizados ao mínimo necessário (processo nº 1029-2023).

3.1 Animais

O estudo foi realizado com total inicial de 48 ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) multíparas, saudáveis, com 21 meses de idade e ciclos estrais irregulares. Os animais foram mantidos em ambiente controlado (22 ± 2 °C; ciclo claro/escuro invertido de 12/12 h; umidade relativa de $55 \pm 10\%$), com acesso ilimitado a água e ração (Neovia Nutrição e Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP, Brasil). As ratas que apresentavam ciclo estral irregular, em diestro persistente (Ferreira et al., 2015; Nicola et al., 2016), foram submetidas a análise de aderência ao exercício físico. A partir disso, os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos: NT/NaCl (não treinados/NaCl), NT/IBO (não treinados/IBO), TA/NaCl (treinamento aeróbio/NaCl) e

TA (treinamento aeróbio/IBO). Todas as ratas participantes do estudo foram submetidos à cirurgia estereotáxica, aos 25 meses de idade, para aplicação de solução salina ou IBO no NBM. Durante o período de treinamento ou após a cirurgia estereotáxica, ocorreram 32 óbitos, resultando em amostra final de 16 ratas.

3.2 Determinação dos grupos de trabalho e critério de inclusão

Apenas ratas múltiparas com 21 meses de idade, com ciclos estrais irregulares e aderentes ao treinamento físico foram incluídas no estudo. O ciclo estral foi verificado por meio de esfregaços vaginais e analisados em microscópio óptico por 2 semanas (Nicola et al., 2016; Ferreira et al., 2015; Long & Evans, 1922). Após essa confirmação, a treinabilidade das ratas foi avaliada para determinar a adesão ao treinamento físico e minimizar as diferenças nos níveis de estresse do treinamento. A adesão ao TA foi avaliada utilizando a escala de desempenho de corrida (pontuada de 1 a 5) proposta por Dishman (1988): 1) o animal se recusa a correr; 2) corrida inconsistente (corre e para ou corre na direção errada); 3) corrida irregular; 4) boa corrida (ocasionalmente corre na parte de trás da esteira); 5) excelente corrida (corre permanentemente na parte da frente da esteira). Apenas as ratas que obtiveram pontuação igual ou superior a 3 foram incluídas nos grupos experimentais.

3.3 Delineamento experimental

Neste estudo investigamos os efeitos do TA no período da periestrofpausa de ratas Wistar. O esquema do delineamento experimental está apresentado na figura 5. No 20º mês das ratas foi realizado análise da citologia vaginal (Long e Evans, 1922; Nicola et al., 2016; Ferreira et al., 2015) para inclusão dos animais que apresentaram ciclo estral irregular, caracterizando o período da periestrofpausa. Em seguida, essas ratas foram submetidas ao teste incremental de velocidade máxima (TIVM) para verificar a aderência ou não ao TA. Confirmada a inclusão, as ratas foram distribuídas, aleatoriamente, nos grupos experimentais. As ratas do grupo TA, realizaram o treinamento 3 x vezes por semana (segunda, quarta e sexta), no período de 120 dias. Aos 25 meses todas as ratas foram submetidos á cirurgia estereotáxica para a infusão de solução salina ou ácido ibotênico no NBM. Vinte e dois dias após a cirurgia as ratas de ambos os grupos (NT e TA) realizaram o último TIVM e 24 horas após esse teste, foi realizado a eutanásia.

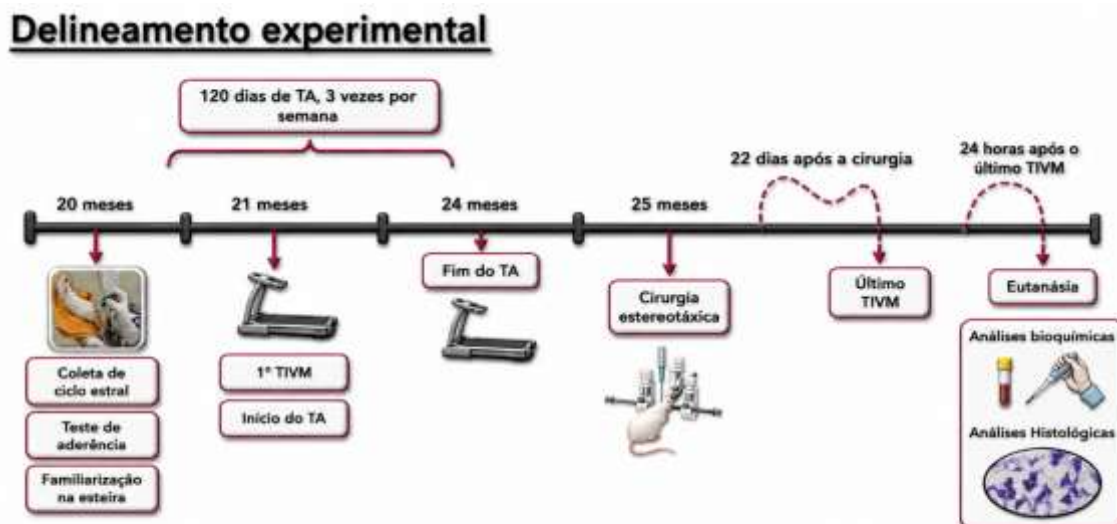


Figura 5. Delineamento experimental esquemático. Teste incremental de velocidade máxima (TIVM); Treinamento aeróbico (TA).

3.4 Protocolo do treinamento aeróbico (TA)

A familiarização com a esteira rolante foi realizada por três dias consecutivos, durante 10 minutos/dia, a velocidade de 10 metros por minuto (m/min) (Nokia et al., 2016; dos Santos Silva et al., 2024). Após a familiarização, as ratas permaneceram inativas por 24 horas e, posteriormente, realizaram o TIVM, conforme proposto por Picoli e colaboradores (2018), para determinar a velocidade de trabalho de cada animal e sua associação com o VO_2 máx. O teste consiste em período inicial de aquecimento de 5 minutos a velocidade de 6 m/min. Em seguida, a velocidade foi aumentada para 11,4 m/min, seguida por aumento de 5,4 m/min a cada 3 minutos de corrida, até a exaustão, caracterizada pela incapacidade do animal de continuar por mais de 10 segundos, atingindo assim o VO_2 pico (Picoli et al., 2018). A inclinação foi mantida em 0°. O programa de treinamento consistiu em sessões ininterruptas de 40 minutos a 70% do VO_2 pico obtido no teste incremental, caracterizando o uso predominante da via aeróbica, três vezes por semana (segunda, quarta e sexta-feira) durante período de 120 dias, com início aos 21 meses. A cada quatro semanas de treinamento, novo teste incremental de velocidade foi realizado para ajustar a intensidade do treinamento.

3.5 Modelo de Neurotoxicidade Induzida por IBO

A cirurgia estereotáxica foi realizada para infundir NaCl ou IBO nas ratas com 25 meses de idade. As ratas foram anestesiadas com cloridrato de cetamina® (0,1 mL/100 g) combinado com cloridrato de xilazina® (0,04 mL/100 g) e fixadas em

aparelho estereotáxico. A infusão unilateral de 1,0 μ L de solução salina ou IBO foi realizada no NBM com seringa para microlitros (Hamilton-Reno, EUA) com base nas coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (AP = 1,32 mm, ML = $\pm$ 2,9 mm, DV = 7,5 mm). O IBO foi dissolvido em solução salina (veículo) a concentração de 5 μ g/1 μ L para infusão unilateral (1,0 μ L, infusão de 0,1 μ L/min) no NBM. Após a injeção, a agulha foi mantida no local mais 1 minuto para evitar refluxo. Os animais dos grupos NaCl receberam solução salina (1,0 μ L, infusão de 0,1 μ L/min) para garantir as mesmas condições do grupo IBO (Karthick et al., 2016; Hosseini et al., 2013). Após a cirurgia, os animais foram mantidos em repouso por 22 dias para se recuperarem da cirurgia estereotáxica e para que a neurotoxina induzisse danos químicos ao grupo lesionado (adaptado de Goshadrou & Sadeghi, 2020).

3.6 Coleta do material biológico

As ratas dos grupos experimentais foram sacrificadas por decapitação (8 animais) realizada pela manhã (das 8h às 11h – ciclo escuro) para minimizar os efeitos do ritmo circadiano. Todos os animais foram eutanasiados 24 horas após o último teste incremental de velocidade máxima. Amostras de sangue foram obtidas do tronco encefálico e os cérebros foram rapidamente removidos e congelados a -80°C . Amostras de sangue coletadas em tubos heparinizados foram centrifugadas e o plasma foi armazenado congelado (-20°C) para posterior análise bioquímica. Os cérebros foram rapidamente removidos e deixados por aproximadamente 1 minuto sobre superfície metálica resfriada com gelo para evitar a degradação de proteínas. Em seguida, os cérebros foram seccionados sagitalmente e os hipocampus foram dissecados, imersos em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,4) para remover o excesso de sangue superficial e armazenados a -80°C para posterior análise do estado redox do hipocampo.

3.7 Análise de Estresse Oxidativo

Este estudo analisou o estado redox do plasma e do hipocampo em ratas não treinadas e em ratas submetidas a treinamento aeróbio, com ou sem exposição ao ácido ibotênico no núcleo basal de Meynert (NBM).

3.7.1 Preparação do Homogenato

No dia da análise bioquímica, os hipocampus isolados foram descongelados

em gelo e lavados em solução salina gelada (0,9% p/v NaCl). Homogeneizador Potter-Elvehjem (modelo MA 099; Marconi, Piracicaba, SP – Brasil) foi usado para preparar homogeneizados de hipocampo a 10% em tampão fosfato de potássio 50 mmol/L (pH 7,4) contendo 0,2% (v/v) de Triton X-100, 10 mmol/L de ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) e 2 mmol/L de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF). Os homogeneizados 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 do estado redox: proteína total (PT), proteína carbonilada (PC), espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), capacidade antioxidante total não enzimática (TAC) por redução de ferro (FRAP), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutational peroxidase (GPx); os sobrenadantes utilizados para a determinação da glutational reduzida total (GSH) foram preparados em ácido tricloroacético (TCA) a 5% (p/v) contendo 2 mmol/L de ácido dietilenotriaminopentaacético (EDTA), centrifugados a 4.000 rpm durante 10 min a 4 °C. Para o teor de proteína, uma amostra de albumina sérica bovina (BSA) (1 mg/mL) foi usada como padrão (Hartree, 1972; Lowry et al., 1951), sendo as absorbâncias lidas a 660 nm e os resultados expressos em µg/µL.

3.7.2 Determinação de proteína carbonilada e dano oxidativo lipídico

A concentração de proteína carbonilada (PC) foi quantificada (450 nm) pelo método alcalino de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Mesquita et al., 2014). O teor de carbonila foi calculado usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{450} = 22,308 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A peroxidação lipídica foi avaliada pela concentração de TBARS (532 nm) (Buege; Aust, 1978). A quantidade de aldeídos formados foi calculada pelo coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{532} = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3.7.3 Determinação da defesa antioxidante não-enzimática

A TAC foi determinada espectrofotometricamente (593 nm) usando a capacidade redutora férrica do plasma (FRAP), conforme descrito anteriormente por Benzie e Strain (1996). Os resultados foram calculados usando curva padrão com diferentes concentrações de soluções de FeSO₄. A concentração de GSH foi determinada usando 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoato) (DTNB) de acordo com o método espectrofotométrico descrito por Beutler e colaboradores (1963). A quantidade de GSH foi determinada pelo coeficiente de extinção molar conhecido de GSH ($1,36 \times$

$104 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Ao contrário do hipocampo, os sobrenadantes de plasma usados para a determinação do GSH total foram preparados em TCA a 10% (p/v) contendo 2 mmol/L de EDTA. Posteriormente, a mistura foi homogeneizada 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.

3.7.4 Determinação da defesa antioxidante enzimática

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

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente (240 nm) medindo-se 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 de atividade enzimática foram determinadas utilizando-se o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($\epsilon_{240} = 0,0394 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade da CAT foi definida como a quantidade de enzima necessária para decompor 1 mmol de H_2O_2 durante 1 minuto.

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

3.8 Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

Os hipocampus foram processados conforme descrito anteriormente para análise do estado redox, sendo o sobrenadante utilizado para a determinação da

atividade da AChE. A atividade dessa enzima foi determinada pelo método de Ellman (Ellman et al., 1961) com adaptações para placa de 96 poços e condições experimentais do presente estudo. A análise baseia-se na hidrólise do iodeto de acetiltiocolina (ATCI) e subsequente formação do ânion 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), cuja formação foi monitorada espectrofotometricamente (412 nm). A absorbância foi registrada ao longo de 6 minutos, com leituras em intervalos regulares, sendo este período previamente estabelecido com base na linearidade da reação. A atividade enzimática foi calculada a partir da variação da absorbância por minuto ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$), sendo os valores convertidos em concentração utilizando o coeficiente de extinção molar do TNB ($\epsilon_{412} = 1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína total das amostras e corrigidos pelo fator de diluição na mistura reacional, sendo expressos em $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de proteína.

3.9 Eutanásia por perfusão transcardíaca

No total 8 animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Syntec® 80 mg/kg/ip) e cloridrato de xilazina (Syntec® 40 mg/kg/ip), para a exposição da região torácica e incisão da cânula no ventrículo esquerdo. Após o clampeamento da aorta abdominal, uma cânula conectada à bomba de perfusão (Miniplus 3 GILSON®) foi introduzida até atingir a aorta ascendente para clampeamento do músculo cardíaco e início da perfusão. A perfusão foi inicialmente realizada com solução salina (20 mL por animal) durante 10 minutos (lavagem sistêmica do animal), seguida de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 mmol/L pH 7,4 durante 50 minutos (fixação do tecido cerebral). Finalmente, os cérebros foram removidos e colocados em recipiente com solução de paraformaldeído a 4% por 2 horas em refrigerador. Ao final desse período, foram imersos em solução de sacarose a 30% diluída em PB 0,2 mmol/L, onde permaneceram até a saturação (aproximadamente 48 h). Em seguida, os cérebros foram cuidadosamente secos em papel absorvente e congelados por imersão rápida em isopentano (temperatura entre -45 e -50°C) por 1 min. Imediatamente após, foram armazenados a -80°C para análises histológicas subsequentes.

3.9.1 Análise Histológica com cresil violeta

Cortes coronais (12 μm de espessura) foram realizados utilizando criostato

(Leica CM3050 S). Após o início da visualização das regiões do hipocampo, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (2007), foram realizados três cortes (em triplicata) de cada cérebro para visualização ao microscópio e confirmação da morfologia. Após a etapa de seccionamento, a coloração com cresil violeta (Buylla et al., 1990) foi realizada para quantificar os corpúsculos de Nissl nas células neurais. Inicialmente, realizou-se a etapa de extração lipídica (água destilada (dH₂O), álcool (EtOH) 50%, 70%, 95% I, 95% II, 100% I, 100% II, xileno I, xileno II), seguida da etapa de coloração (EtOH 100% I, 100% II, 100%, 95% II, 95% I, 70%, 50%, dH₂O, tionina, dH₂O, dH₂O, EtOH 50%, 70%, 95% I, 95% II, 100% I, 100% II, xileno I, xileno II, xileno III). Em seguida, as lâminas foram montadas e analisadas utilizando microscópio Leica acoplado a câmera digital (Leica DM4000 B; Wetzlar, Alemanha). Foram realizadas fotografias das regiões CA1 e CA3 do hipocampo das ratas. As análises foram realizadas utilizando objetiva de ampliação de 40x no programa LAS V4.2. Para obter os parâmetros das diferentes regiões do hipocampo, volume de interesse (VOI) de 100 µm foi determinado em cada região para a contagem manual de células neurais Nissl-positivas nas regiões CA1 e CA3 das imagens digitalizadas. Apenas células com núcleos e nucléolos identificáveis foram contadas.

3.10 Análise Estatística

Os dados obtidos neste estudo estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para a análise do teste incremental de velocidade máxima (TIVM), foram realizadas abordagens estatísticas diferentes, conforme o objetivo experimental. A comparação do desempenho (TIVM) das ratas do grupo NT, no início (21^o mês de idade) e ao final (25^o mês de idade) do período experimental foi realizada pelo teste *t* de Student. O mesmo teste também foi utilizado para comparar os grupos NT e TA após a cirurgia estereotóxica, considerando que, no início do 25^o mês de idade as ratas receberam infusão intracerebral de NaCl (TA/NaCl) ou ácido ibotênico (TA/IBO), sendo as avaliações realizadas 22 dias após o procedimento (25 $\times$ 25 meses). A análise longitudinal do desempenho das ratas submetidas ao TA ao longo dos meses experimentais (21^o ao 25^o mês de idade) foi realizada por ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* de Tukey. Para as análises de estresse oxidativo, da atividade da acetilcolinesterase e da marcação de corpúsculos de Nissl, a normalidade foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, e foi utilizada ANOVA de duas vias,

considerando os fatores treinamento (NT vs. TA) e intervenção (NaCl vs. IBO). Quando identificadas diferenças significantes, aplicou-se o teste *post hoc* de Tukey para comparações múltiplas entre os grupos. O tamanho de efeito das análises de variância foi estimado pelo *eta* quadrado parcial (η^2_p ; *partial eta squared*). O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism, versão 10 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros Gerais

A análise de esfregaços vaginais de ratas Wistar aos 20 meses revelou as fases de diestro I em 48% e diestro II em 32% dos casos durante o período de análise do ciclo estral em todas as ratas experimentais, caracterizando o período de diestro persistente (Figura 6). Essa irregularidade no ciclo estral foi marcada por maior variabilidade na duração das fases do ciclo estral e recorrência da citologia vaginal leucocitária em 3 ou 4 ciclos, característica da fase de periostropausa, indicando essas ratas à serem incluídas no estudo da senescência reprodutiva.

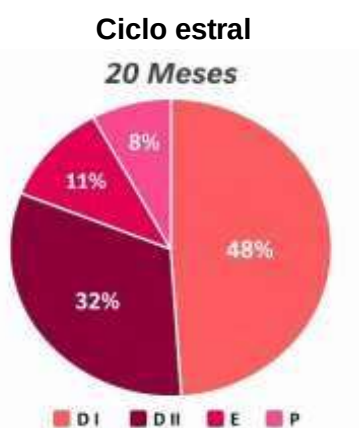


Figura 6. Incidência das fases do ciclo estral das ratas Wistar com 20 meses em período equivalente a três ciclos consecutivos. Abreviações: P = proestro; E = estro; D I = diestro I; D II = diestro II.

As ratas de todos os grupos experimentais apresentaram diminuição no peso corporal ao final de 25 meses, em comparação com o peso aos 20 meses de idade. No entanto, essa redução foi significativa das ratas do grupo NT-NaCl. Além disso, não foi observada redução significativa no peso uterino e ovariano entre os grupos.

Tabela 1 – Peso corporal, uterino e ovariano das ratas dos grupos experimentais:

	Peso corporal inicial (g)- 20Me	Pesocorporal final (g)- 25 Me	Peso do útero (g)- 25Me	Peso dos ovários (g)- 25Me
NT-NaCl	415,3±14,17	336,8±22,80*	0,807±0,130	0,116±0,010
NT-IBO	406,5±15,02	366,5±15,64	0,854±0,136	0,135±0,004
TA-NaCl	386,0±11,36	368,7±13,85	0,934±0,314	0,175±0,034
TA-IBO	372,0±14,23	344,3±15,39	0,853±0,270	0,158±0,037

Tabela 1. Os valores representam a média ± erro padrão da média (EPM) dos grupos experimentais. NT = não treinado; TA = treinamento aeróbio; NaCl = solução salina; IBO = ácido ibotênico. Número de animais por grupo = 6-8. * $p = 0,016$ vs NT-NaCl 20Me.

4.2 Treinamento Aeróbio

O parâmetro analisado TIVM foi realizado a cada quatro semanas com o objetivo de ajustar a velocidade do treinamento (do 1^o ao 5^o teste). O sexto e último teste foi conduzido após a cirurgia estereotáxica, na qual as ratas dos grupos NT-NaCl e TA-NaCl receberam infusão de solução salina e as dos grupos NT-IBO e TA-IBO receberam ácido ibotênico. Após o procedimento, as ratas permaneceram em repouso (22 dias) para recuperação e para que o ácido induzisse os danos químicos nas ratas. No grupo NT, o TIVM foi avaliado aos 21 e 25 meses. Nesses grupos, tanto o NT-NaCl (Figura 7A) quanto o NT-IBO (Figura 7B) apresentaram redução significativa na velocidade máxima aos 25 meses quando comparados a eles mesmos aos 21 meses de idade, indicando possível diminuição da capacidade cardiorrespiratória.

Os animais do grupo TA, tanto os que receberam NaCl quanto os que receberam IBO (Figuras 7C e 7D, respectivamente), não apresentaram redução cardiorrespiratória significativa ao longo dos testes incrementais, indicando possível adaptação ao TA. Embora tenha ocorrido discreta redução no último teste, realizado após a cirurgia, o desempenho permaneceu relativamente estável, sem alterações estatisticamente significantes.

Teste incremental de velocidade máxima

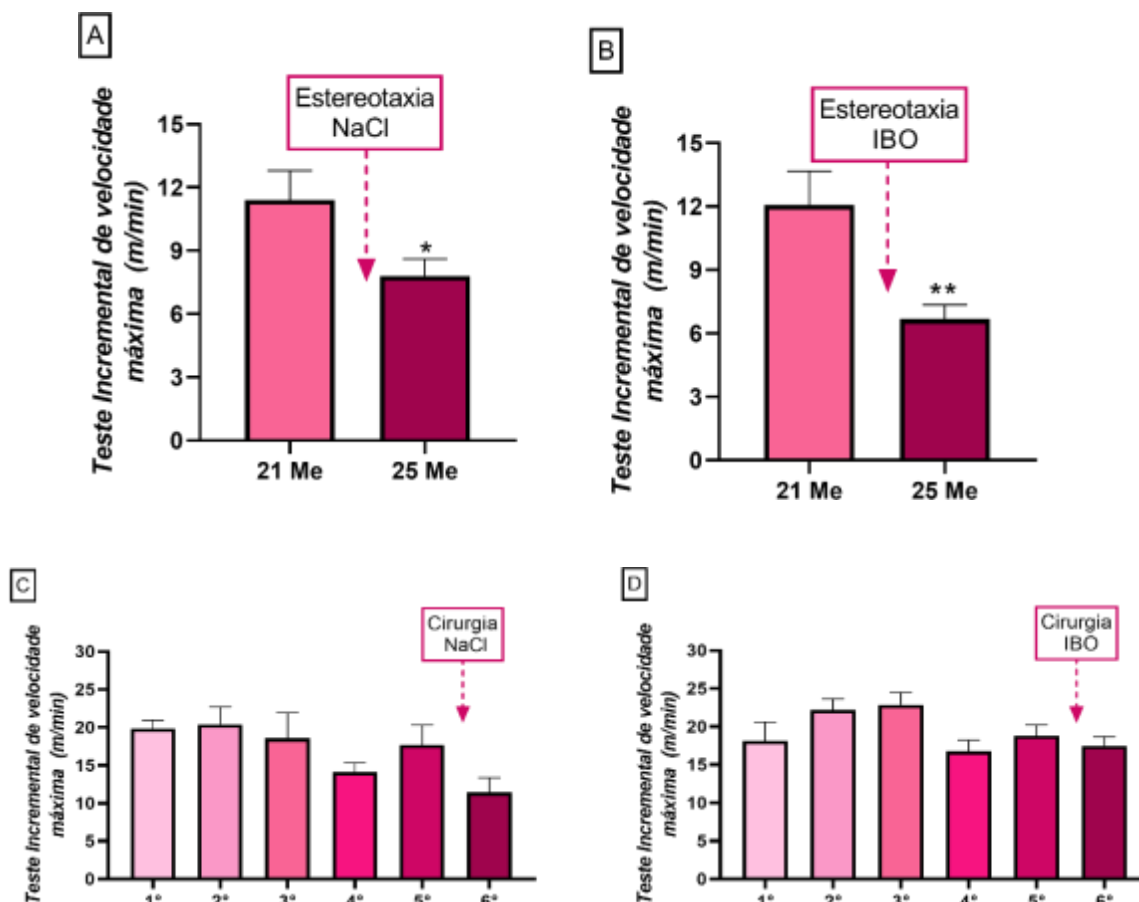


Figura 7. Análise do teste incremental de velocidade máxima (TIMV) em ratos Wistar senis. A e B: Teste aeróbio realizado em ratos Wistar com 21 e 25 meses de idade (grupos NT/NaCl e NT/IBO). C e D: Teste de velocidade incremental realizado durante o período de treinamento (3x/semana/120 dias) em ratos Wistar com idade entre 21 e 25 meses (grupos TA/NaCl e TA/IBO). O TIMV refere-se ao primeiro (T1), segundo (T2), terceiro (T3), quarto (T4) e quinto (T5) testes. A cirurgia estereotáxica para infusão de NaCl (grupos NT e TA-NaCl) ou IBO (grupos NT e TA-IBO) foi realizada 22 dias antes do 6º teste. Os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados do grupo TA foram analisados por ANOVA de uma via e *post test* de Tukey, enquanto os dados do grupo NT foram analisados por teste *t* de *Student* pareado. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). * $p = 0,0493$; ** $p = 0,0075$.

A análise estatística realizada entre os grupos TA-NaCl e TA-IBO no sexto e último TIMV (Figura 8) revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. As ratas do grupo TA-IBO apresentaram maiores valores de velocidade máxima em relação ao grupo TA-NaCl, mostrando melhor desempenho no teste final.

TIVM das ratas do grupo TA após cirurgia estereotáxica

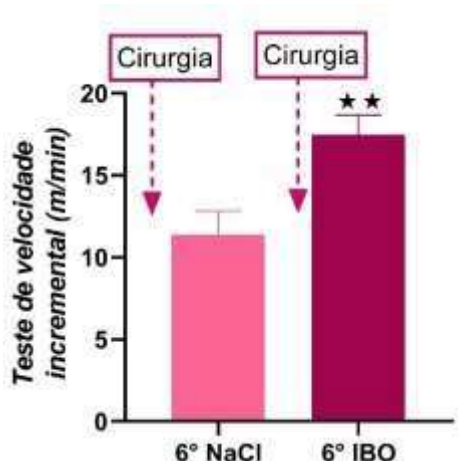


Figura 8. Análise do TIVM das ratas do grupo TA após cirurgia estereotáxica. Ratas wistar senis realizaram treinamento aeróbio (3x/semana/120 dias) desde o 21^o até o 25^o mês de idade. Os dados do 6^o teste de velocidade dos grupos TA-NaCl e TA-IBO foram analisados pelo teste *t* de Student não pareado; os valores são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). ** $p = 0,0063$.

4.3 Estresse Oxidativo

4.3.1 Dano oxidativo proteico após a realização do TA

A concentração de proteína carbonilada (PC) no hipocampo (Fig. 9A) foi analisada por ANOVA de duas vias, considerando os efeitos do TA e da administração de ácido ibotênico. Não foi observado efeito significativo da interação dos fatores ($F(1,12) = 0,61$; $p = 0,45$; $\eta^2_p = 0,049$). Da mesma forma, o fator IBO não apresentou efeito significativo ($F(1,12) = 0,57$; $p = 0,47$; $\eta^2_p = 0,045$), sugerindo impacto reduzido sobre os níveis de carbonilação proteica. Em contraste, o TA promoveu efeito altamente significativo ($F(1,12) = 82,57$; $p < 0,0001$; $\eta^2_p = 0,873$), com tamanho de efeito muito elevado, indicando que o TA foi o principal determinante das alterações observadas na proteína carbonilada no hipocampo. Análises *post hoc* de Tukey mostraram redução significativa de PC no hipocampo das ratas que realizaram o TA e receberam NaCl ($p = 0,0005$) ou IBO ($p < 0,0001$).

A análise da concentração de PC no plasma (Fig. 9B) também não revelou efeito significativo da interação dos fatores ($F(1,12) = 1,55$; $p = 0,24$; $\eta^2_p = 0,114$). O fator IBO apresentou efeito significativo ($F(1,12) = 6,87$; $p = 0,022$; $\eta^2_p = 0,364$), com tamanho de efeito moderado a elevado, sugerindo que o IBO influenciou os níveis de carbonilação proteica no plasma. Por outro lado, o TA apresentou efeito com tendência à significância ($F(1,12) = 4,60$; $p = 0,053$; $\eta^2_p = 0,277$), indicando efeito de magnitude moderada sobre essa variável. A análise *post hoc* de Tukey não

demonstrou a ocorrência de resultados com diferenças significantes.

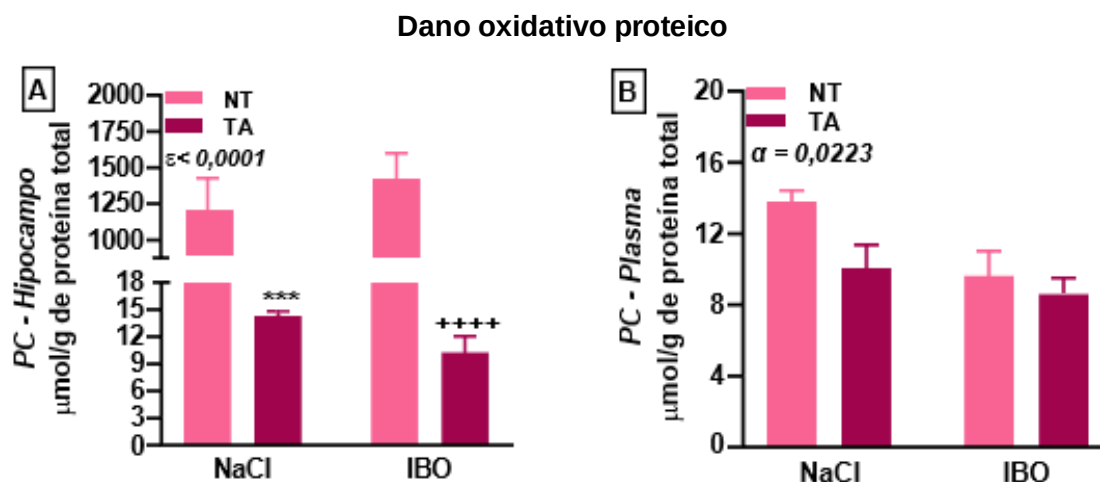


Figura 9 - Dano oxidativo proteico. Concentração de proteína carbonilada no hipocampo (A) e plasma (B) após a realização do treinamento aeróbio (3x/semana/120 dias) em ratas senis (21 - 25 Me). Os dados foram analisados por two-way ANOVA seguido de testes *post hoc* com múltiplas comparações. Os valores são apresentados como média $\pm$ (EPM). Símbolos para diferença de significância entre os grupos: ε = treinamento (TA/NT); α = intervenção (NaCl/IBO); *Post hoc* de Tukey: (A) *** $p = 0,0004$ (vs NT-NaCl); +++++ $p < 0,0001$ (vs NT-IBO); Número de animais 4/grupo.

4.3.2 Dano oxidativo lipídico após a realização do TA

A análise por ANOVA de duas vias dos níveis de TBARS no hipocampo (Fig. 10A), revelou a ocorrência não significativa da interação dos fatores ($F(1,12) = 0,13$; $p = 0,72$; $\eta^2_p = 0,011$). Da mesma forma, o fator IBO não apresentou efeito significativo ($F(1,12) = 0,13$; $p = 0,72$; $\eta^2_p = 0,010$), sugerindo impacto mínimo sobre os níveis de peroxidação lipídica. Em contraste, o TA promoveu efeito altamente significativo ($F(1,12) = 74,66$; $p < 0,0001$; $\eta^2_p = 0,861$), com tamanho de efeito muito elevado, indicando que o treinamento foi o principal determinante das alterações observadas nos níveis de TBARS no hipocampo. Assim, o *post hoc* de Tukey demonstrou que tanto os animais do grupo TA-NaCl ($p = 0,0002$) quanto os do grupo TA-IBO ($p = 0,0004$) apresentaram redução significativa desse dano no hipocampo.

A análise ANOVA de duas vias dos níveis de TBARS no plasma (Fig. 10B) mostrou o efeito não significativo da interação dos fatores ($F(1,12) = 0,00012$; $p = 0,99$; $\eta^2_p = 0,00001$), indicando ausência de interação do TA x IBO. O fator IBO apresentou efeito altamente significativo ($F(1,12) = 27,82$; $p = 0,0002$; $\eta^2_p = 0,699$), com tamanho de efeito elevado, demonstrando forte influência da infusão de IBO sobre os níveis de peroxidação lipídica no plasma. Além disso, o TA também promoveu efeito significativo ($F(1,12) = 6,68$; $p = 0,0239$; $\eta^2_p = 0,357$), com magnitude moderada a alta, mostrando

que o TA contribuiu para as alterações observadas nessa variável. A análise *post hoc* de Tukey demonstrou menor atividade de TBARs nos grupos que receberam IBO (NT: $p = 0,0134$ e TA: $p = 0,0131$).

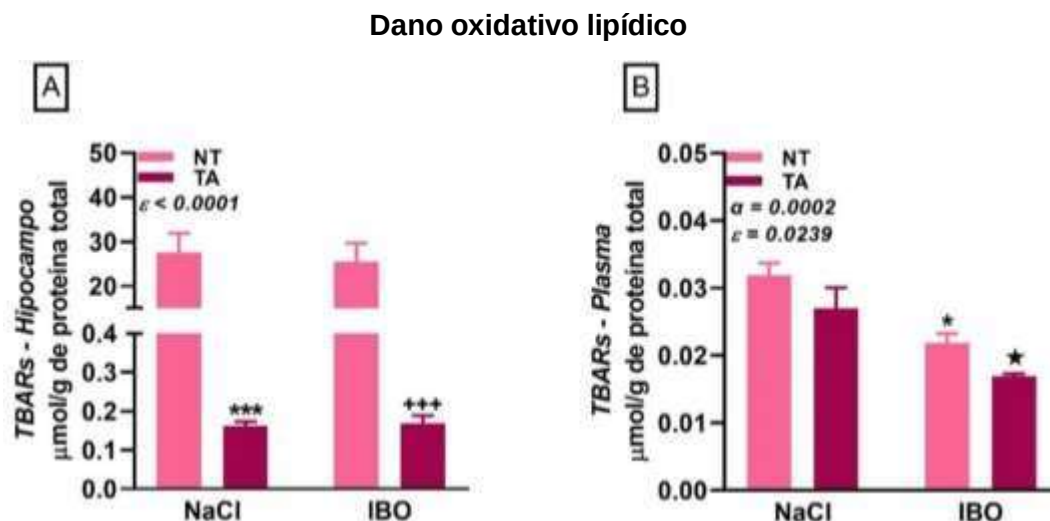


Figura 10. Dano oxidativo lipídico. Concentração de TBARs no hipocampo (A) e plasma (B) após a realização do treinamento aeróbio (3x/semana/120 dias) em ratas senis (21 - 25 Me). Os dados foram analisados por two-way ANOVA seguido de testes *post hoc* com múltiplas comparações. Os valores são apresentados como média $\pm$ (EPM). Símbolos para diferença de significância entre os grupos: ε = treinamento (TA/NT); α = intervenção (NaCl/IBO); *Post hoc* de Tukey: (A) $^{***} p = 0,0004$ (vs NT-IBO); (B) $^{*} p = 0,0134$ (vs NT-NaCl); $^{*} p = 0,0131$ (vs TA-NaCl); Número de animais 4/grupo.

4.3.3 Defesa antioxidante não enzimática após a realização do TA

A análise da capacidade antioxidante total (TAC) não enzimática no hipocampo (Fig. 11A) revelou efeito significativo da interação dos fatores ($F(1,12) = 6,25$; $p = 0,0279$; $\eta^2_p = 0,342$). Além disso, o fator IBO apresentou efeito significativo ($F(1,12) = 5,80$; $p = 0,033$; $\eta^2_p = 0,326$), com tamanho de efeito moderado a elevado. O TA também promoveu efeito significativo ($F(1,12) = 17,72$; $p = 0,0011$; $\eta^2_p = 0,596$), com tamanho de efeito elevado, sugerindo forte influência do TA sobre a capacidade antioxidante no hipocampo. A análise *post hoc* de Tukey demonstrou aumento significativo ($p = 0,0023$) de TAC no hipocampo das ratas que realizaram TA e nas ratas NT após a infusão de NaCl ($p = 0,0209$).

A TAC no plasma (Fig. 11B), analisada por ANOVA de duas vias, mostrou efeito não significativo da interação dos fatores ($F(1,12) = 0,65$; $p = 0,44$; $\eta^2_p = 0,051$). O fator IBO apresentou efeito significativo ($F(1,12) = 11,08$; $p = 0,006$; $\eta^2_p = 0,480$), com tamanho de efeito elevado, sugerindo forte influência da infusão de IBO sobre a capacidade antioxidante plasmática. O TA também promoveu efeito significativo

($F(1,12) = 9,26$; $p = 0,010$; $\eta^2_p = 0,435$), com tamanho de efeito elevado, indicando que o TA contribuiu significativamente para as alterações observadas nessa variável. A análise *post hoc* de Tukey não demonstrou a ocorrência de resultados com diferenças significantes.

Defesa antioxidante não-enzimática (TAC)

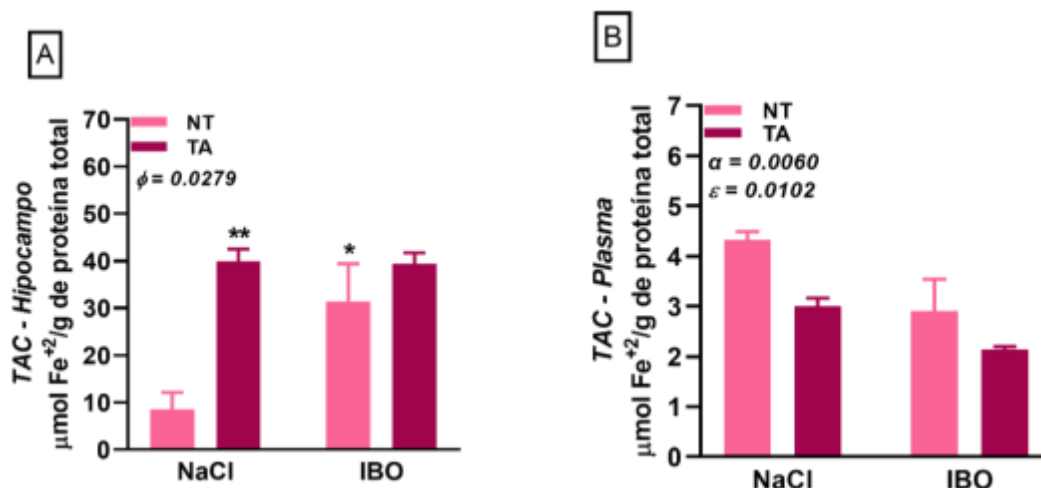


Figura 11. Defesa antioxidante não enzimática. Análise da defesa antioxidante não enzimática (TAC) no hipocampo (A) e no plasma (B) após treinamento aeróbio (3x/semana/120 dias) em ratas senis (21 - 25 Me). Os dados foram analisados por two-way ANOVA seguido de testes *post hoc* com múltiplas comparações. Os valores são apresentados como média $\pm$ (EPM). Símbolos para diferença de significância entre os grupos: ϕ = interação (treinamento x intervenção); ε = treinamento (TA/NT); α = intervenção (NaCl/IBO); *Post hoc* de Tukey: (A) ** $p = 0,0023$ (vs NT-NaCl); * $p = 0,0209$ (vs NT-NaCl); Número de animais 4/grupo.

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo foram analisados por ANOVA de duas vias (Fig. 12A). Foi observado efeito significativo da interação dos fatores ($F(1,12) = 6,47$; $p = 0,0257$; $\eta^2_p = 0,351$). O fator IBO também apresentou efeito significativo ($F(1,12) = 6,48$; $p = 0,026$; $\eta^2_p = 0,351$), com tamanho de efeito moderado a elevado. Além disso, o TA promoveu efeito altamente significativo ($F(1,12) = 31,12$; $p < 0,0001$; $\eta^2_p = 0,722$), com tamanho de efeito elevado, indicando forte influência do treinamento sobre os níveis de GSH no hipocampo. A análise *post hoc* de Tukey dos parâmetros de defesa antioxidante não enzimática demonstrou que o IBO influencia significativamente as concentrações de GSH no hipocampo das ratas NT. Foram observadas diferenças significantes entre os grupos NT-IBO vs NT-NaCl ($p = 0,0166$) e NT-IBO vs TA-IBO ($p = 0,0005$).

No plasma (Fig. 12B), os níveis de GSH analisados por ANOVA de duas vias evidenciaram a não ocorrência de efeitos significantes da interação dos fatores

($F(1,12) = 0,22$; $p = 0,65$; $\eta^2p = 0,018$), nem do fator IBO ($F(1,12) = 0,09$; $p = 0,77$; $\eta^2p = 0,008$), tampouco do TA ($F(1,12) = 0,37$; $p = 0,55$; $\eta^2p = 0,030$). Esses resultados indicam que não houve influência significativa dos fatores analisados sobre os níveis de GSH no plasma, sendo os tamanhos de efeito considerados pequenos.

Defesa antioxidante não-enzimática (GSH)

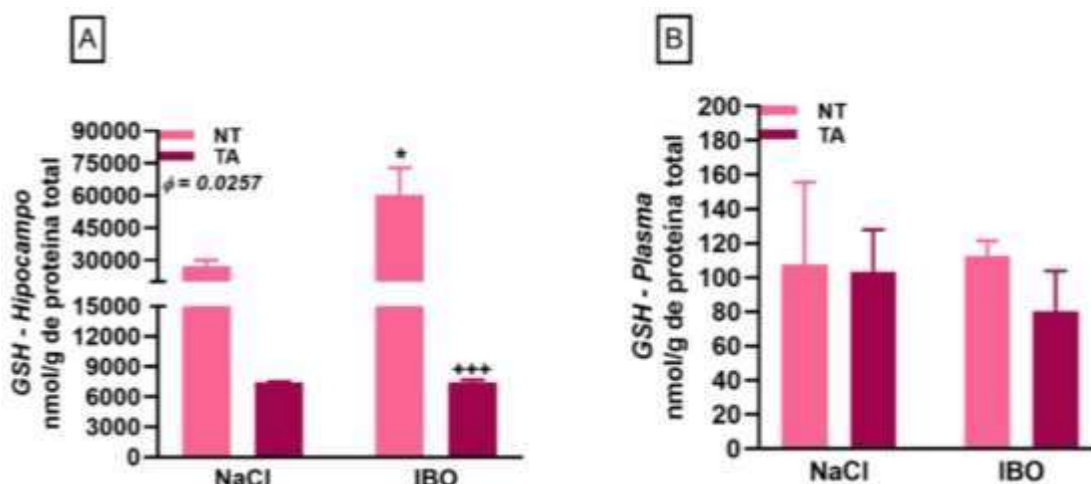


Figura 12. Defesa antioxidante não enzimática. Análise da defesa antioxidante não enzimática da glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo (A) e no plasma (B) após treinamento aeróbio (3x/semana/120 dias) em ratas senis (21 - 25 Me). Os dados foram analisados por two-way ANOVA seguido de testes *post hoc* com múltiplas comparações. Os valores são apresentados como média $\pm$ (EPM). Símbolos para diferença de significância entre os grupos: $\emptyset$ = interação (treinamento x intervenção); *Post hoc* de Tukey: (A) * $p = 0,0166$ (vs NT-NaCl); *** $p = 0,0005$ (vs NT-IBO). Número de animais 4/grupo.

4.3.4 Defesa Antioxidante Enzimática

A atividade da superóxido dismutase (SOD) no hipocampo (Fig. 13A), analisada por ANOVA de duas vias, não revelou a ocorrência de efeitos significantes da interação dos fatores ($F(1,12) = 2,99$; $p = 0,11$; $\eta^2p = 0,199$) nem do fator IBO ($F(1,12) = 2,20$; $p = 0,16$; $\eta^2p = 0,155$), embora ambos apresentem tamanhos de efeito moderados. Em contraste, o TA promoveu efeito altamente significativo ($F(1,12) = 90,86$; $p < 0,0001$; $\eta^2p = 0,883$), com tamanho de efeito muito elevado, indicando forte influência do TA sobre a atividade da SOD no hipocampo. O teste *post hoc* de Tukey mostrou que as ratas treinadas (TA-NaCl: $p = 0,0007$ e TA-IBO: $p < 0,0001$) apresentaram menor atividade enzimática da SOD.

A atividade da SOD no plasma (Fig. 13B) revelou efeito não significativo da interação dos fatores ($F(1,12) = 0,45$; $p = 0,52$; $\eta^2p = 0,036$). O fator IBO apresentou efeito significativo ($F(1,12) = 8,33$; $p = 0,0137$; $\eta^2p = 0,410$), com tamanho de efeito moderado a elevado, sugerindo influência da infusão de IBO sobre a atividade da SOD

plasmática. O TA também promoveu efeito significativo ($F(1,12) = 5,86$; $p = 0,0323$; $\eta^2_p = 0,328$), com magnitude moderada, indicando que o TA contribuiu para as alterações observadas nessa variável. A análise de *post hoc* também mostrou que as concentrações de SOD no plasma não apresentaram alterações significantes entre os grupos.

Defesa antioxidante enzimática (SOD)

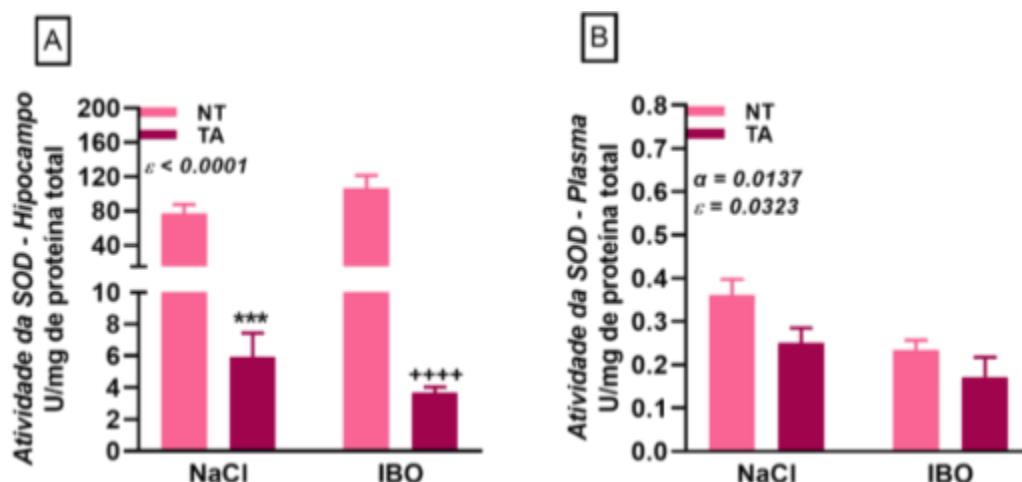


Figura 13. Defesa antioxidante enzimática. Análise da defesa antioxidante enzimática da superóxido dismutase (SOD) no hipocampo (A) e no plasma (B) após treinamento aeróbico (3x/semana/120 dias) em ratas senis (21 - 25 Me). Os dados foram analisados por two-way ANOVA seguido de testes *post hoc* de Tukey. Os valores são apresentados como média $\pm$ (EPM). Símbolos para diferença de significância entre os grupos: ϵ = treinamento (TA/NT); α = intervenção (NaCl/IBO); *Post hoc* de Tukey: (A) *** $p = 0,0007$ (vs NT-NaCl); **** $p < 0,0001$ (vs NT-IBO). Número de animais 4/grupo.

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi analisada por ANOVA de duas vias (Fig. 14). No hipocampo (Fig. 14A) não foram observados efeitos significantes da interação dos fatores ($F(1,12) = 0,86$; $p = 0,37$; $\eta^2_p = 0,067$) nem do fator IBO ($F(1,12) = 0,55$; $p = 0,47$; $\eta^2_p = 0,044$), indicando influência limitada desses fatores sobre essa variável. Em contraste, o TA promoveu efeito altamente significativo ($F(1,12) = 35,10$; $p < 0,0001$; $\eta^2_p = 0,745$), com tamanho de efeito elevado, indicando que o TA foi o principal determinante das alterações observadas na atividade da GPx no hipocampo. A análise de comparações múltiplas de Tukey demonstrou que ambos os grupos TA apresentaram diminuição da atividade da GPx em comparação aos grupos NT (NT-NaCl: $p = 0,0187$ e NT-IBO: $p = 0,0020$).

A GPx no plasma (Fig. 14B) não apresentou efeito significativo da interação dos fatores ($F(1,12) = 4,05$; $p = 0,067$; $\eta^2_p = 0,253$), embora tenha sido identificada tendência com tamanho de efeito moderado. O fator IBO também apresentou

tendência à significância ($F(1,12) = 3,55$; $p = 0,084$; $\eta^2_p = 0,228$), sugerindo possível influência sobre a atividade da enzima. Por outro lado, o TA não apresentou efeito significativo ($F(1,12) = 2,31$; $p = 0,15$; $\eta^2_p = 0,161$), sugerindo efeito de magnitude moderada, porém sem significância estatística.

Defesa antioxidante enzimática (GPx)

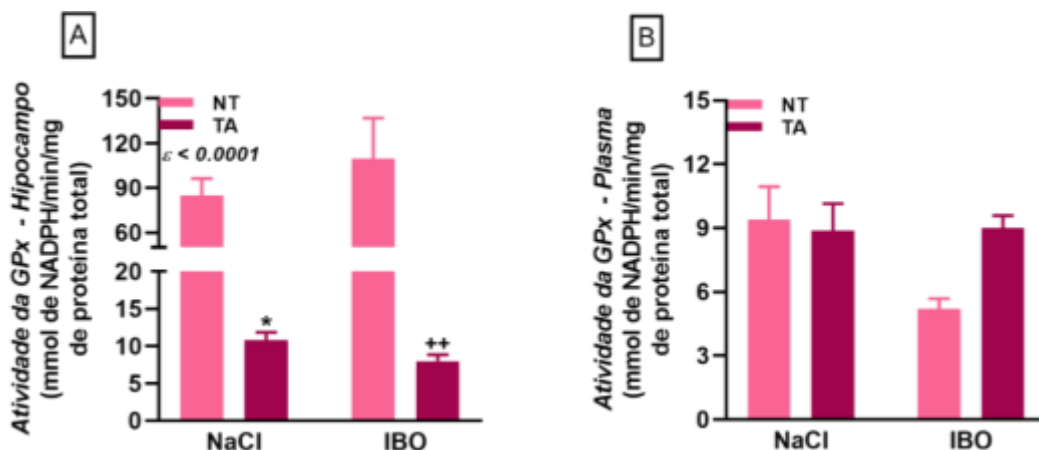


Figura 14. Defesa antioxidante enzimática. Análise da defesa antioxidante enzimática da glutathione peroxidase (GPx) no hipocampo (A) e no plasma (B) após treinamento aeróbio (3x/semana/120 dias) em ratos senis (21 – 25 Me). Os dados foram analisados por two-way ANOVA seguido de testes *post hoc* com múltiplas comparações. Os valores são apresentados como média $\pm$ (EPM). Símbolos para diferença de significância entre os grupos: ε = treinamento (TA/NT); *Post hoc* de Tukey: (A) * $p = 0,0187$ (vs NT-NaCl); ** $p = 0,0020$ (vs NT-IBO). Número de animais 4/grupo.

A análise por ANOVA de duas vias da atividade da catalase (CAT) no plasma (Fig. 15) evidenciou a ocorrência de efeito não significativo da interação dos fatores ($F(1,12) = 2,61$; $p = 0,13$; $\eta^2_p = 0,179$), nem do fator IBO ($F(1,12) = 0,10$; $p = 0,75$; $\eta^2_p = 0,008$). Por outro lado, o TA promoveu efeito significativo ($F(1,12) = 7,94$; $p = 0,0155$; $\eta^2_p = 0,398$), com tamanho de efeito moderado a elevado, mostrando que o TA influenciou significativamente a atividade da CAT no plasma. A análise *post hoc* demonstrou que os animais do grupo TA-IBO apresentaram maior ação sistêmica dessa enzima em comparação aos animais não treinados (NT-IBO: $p = 0,0375$). A análise dessa enzima no tecido hipocampal não apresentou resultados detectáveis, pois não foi observada atividade enzimática mensurável nas amostras analisadas. Foram realizadas várias tentativas de padronização, incluindo variações nas condições experimentais e ensaios com a enzima pura como controle positivo. No entanto, mesmo sob essas condições, não foi possível detectar atividade da CAT tornando a quantificação confiável dessa enzima inviável no presente estudo.

Defesa antioxidante enzimática (CAT)

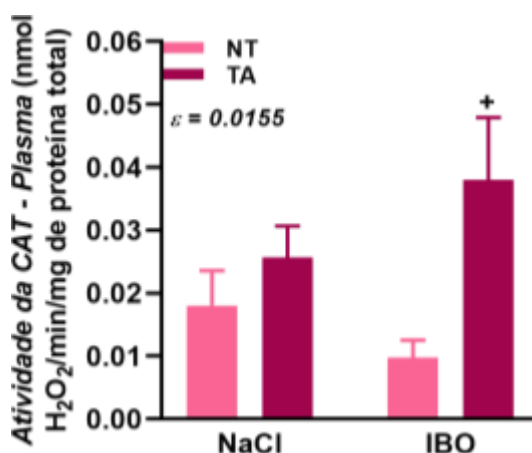


Figura 15. Defesa antioxidante enzimática. Análise da defesa antioxidante enzimática da catalase (CAT) no plasma após treinamento aeróbio (3x/semana/120 dias) em ratas senis (21 - 25 Me). Os dados foram analisados por two-way ANOVA seguido de testes *post hoc* com múltiplas comparações. Os valores são apresentados como média $\pm$ (EPM). Símbolos para diferença de significância entre os grupos: ε = treinamento (TA/NT); *Post hoc* de Tukey: + p = 0,0375 (vs NT- IBO). Número de animais 4/grupo.

4.4. Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE (Fig.16) foi analisada por ANOVA de duas vias (treinamento x intervenções). Não foi observado efeito significativo da interação dos fatores ($F(1,12) = 1,73$; $p = 0,21$; $\eta^2_p = 0,126$), indicando que os efeitos do TA e da lesão induzida pelo IBO ocorreram de forma independente. O fator IBO apresentou tendência à significância estatística ($F(1,12) = 3,92$; $p = 0,07$; $\eta^2_p = 0,246$), sugerindo influência moderada da neurotoxicidade sobre a atividade enzimática. Por outro lado, o TA promoveu efeito significativo ($F(1,12) = 13,00$; $p = 0,0036$; $\eta^2_p = 0,520$), com tamanho de efeito elevado, demonstrando que o TA foi o principal determinante associado as alterações observadas na atividade da AChE. A análise *post hoc* de Tukey demonstrou que o grupo TA-IBO apresentou menor atividade dessa enzima quando comparado ao grupo NT-IBO ($p = 0,0036$). Esse resultado indica que o TA prévio foi capaz de reduzir a atividade enzimática aumentada pela exposição ao IBO, sugerindo efeito modulador do treinamento frente ao dano neurotóxico. Não foram observadas diferenças significantes entre os demais grupos experimentais. Em conjunto, esses resultados sugerem que o TA exerceu efeito neuroprotetor sobre o sistema colinérgico, atenuando as alterações da atividade da AChE induzidas pelo ácido ibotênico.

Atividade da acetilcolinesterase

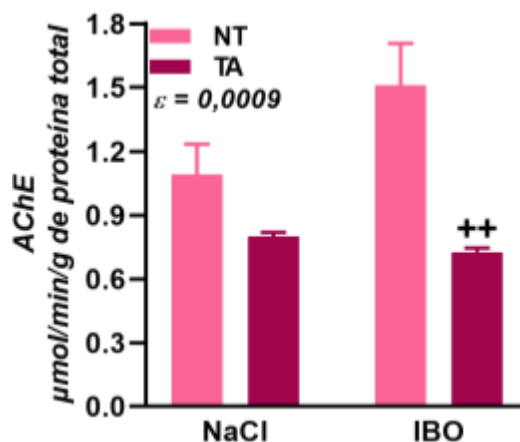


Figura 16. Análise da atividade da enzima AChE no hipocampo após treinamento aeróbio (3x/semana/120 dias) em ratas senis (21 - 25 Me). Os dados foram analisados por *two-way* ANOVA seguido de testes *post hoc* com múltiplas comparações. Os valores são apresentados como média $\pm$ (EPM). Símbolos para diferença de significância entre os grupos: ε = treinamento (TA/NT); *Post hoc* de Tukey: ++ $p=0,0036$ (vs NT- IBO). Número de animais 4/grupo.

4.5. Análise Histológica dos corpúsculos de Nissl

A análise histológica dos neurônios Nissl-positivos nas sub-regiões CA1 e CA3 do hipocampo evidenciou que o TA modulou a integridade neuronal de maneira dependente da exposição ao IBO. Na região CA1 (Fig. 17A), a ANOVA de duas vias revelou efeito significativo da interação de TA e IBO ($F(1,12) = 8,42$; $p = 0,013$; $\eta^2_p = 0,412$), indicando que os efeitos do TA sobre a viabilidade neuronal variaram conforme a condição lesiva induzida pelo IBO. Embora o fator IBO isoladamente não tenha apresentado efeito significativo ($F(1,12) = 2,54$; $p = 0,14$; $\eta^2_p = 0,175$), observou-se tamanho de efeito moderado, sugerindo impacto biológico relevante sobre a integridade neuronal. Além disso, o TA promoveu efeito significativo ($F(1,12) = 5,42$; $p = 0,038$; $\eta^2_p = 0,311$), demonstrando influência moderada a elevada do treinamento sobre a preservação neuronal na região CA1. A análise *post hoc* mostrou que as ratas TA-NaCl apresentaram aumento significativo no número de neurônios Nissl-positivos em comparação aos animais do grupo NT-NaCl ($p = 0,0140$), indicando potencial efeito neuroprotetor do treinamento em condições fisiológicas. A administração de IBO reduziu o número de neurônios Nissl-positivos, confirmando o efeito neurotóxico. Neste contexto, o grupo TA-IBO apresentou menor número de neurônios Nissl-positivos que o TA-NaCl ($p = 0,0348$), reforçando que, embora o treinamento possa oferecer proteção neural, o IBO ainda induziu dano neuronal mensurável na região

CA1.

Na região CA3 (Fig. 17B), também foi evidenciada interação significativa de TA e IBO ($F(1, 12) = 9,778$; $p = 0,0087$; $\eta^2_p = 0,449$), indicando novamente que os efeitos do treinamento dependeram da condição de exposição ao IBO. O fator IBO não apresentou efeito significativo isoladamente ($F(1,12) = 1,86$; $p = 0,20$; $\eta^2_p = 0,134$), sugerindo efeito de pequena a moderada magnitude sobre a integridade neuronal. O TA apresentou tendência à significância estatística ($F(1,12) = 4,67$; $p = 0,051$; $\eta^2_p = 0,280$), com tamanho de efeito moderado, sugerindo possível influência do treinamento sobre a preservação neuronal na sub-região CA3 do hipocampo. A análise de comparações múltiplas de Tukey mostrou que o grupo NT-IBO apresentou redução significativa no número de neurônios Nissl-positivos em comparação ao grupo NT-NaCl ($p = 0,0349$), confirmando a ação neurotóxica do IBO também nesta sub-região do hipocampo. No entanto, as ratas do grupo TA-IBO apresentaram maior número de células Nissl-positivas quando comparadas ao grupo NT-IBO ($p = 0,0130$). Esse resultado sugere que o TA atenuou parcialmente a perda neuronal induzida pelo IBO, sugerindo efeito neuroprotetor mais evidente na sub-região CA3 do hipocampo.

Análise histológica dos corpúsculos de Nissl

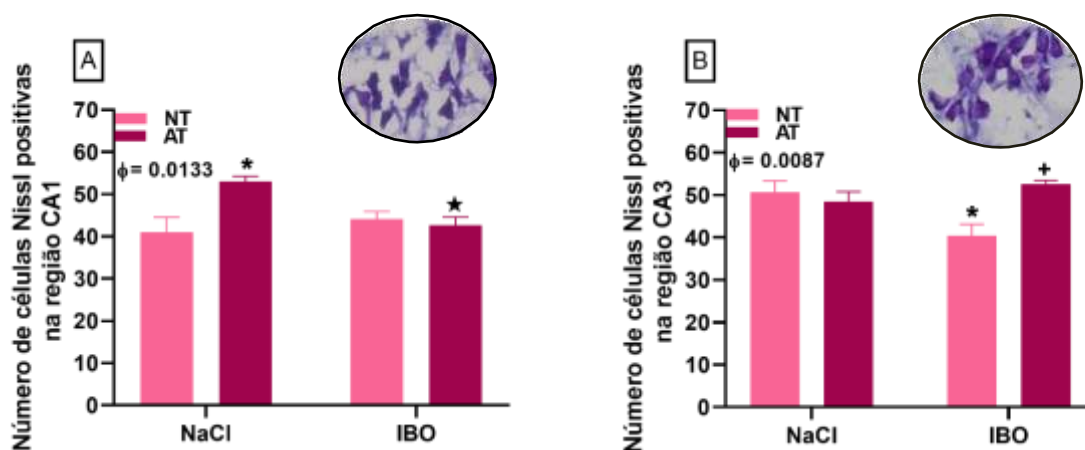


Figura 17. Quantificação de células Nissl-positivas no hipocampo por coloração com cresil violeta em ratas Wistar com 25 meses. (A) Região CA1; (B) Região CA3. Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias com comparações múltiplas. Os valores são apresentados como média $\pm$ (EPM). Símbolos para diferença de significância entre os grupos: ϕ = interação (treinamento x intervenção); *Post hoc* de Tukey: (A) * $p = 0,0140$ (vs NT-NaCl); * $p = 0,0348$ (vs TA-NaCl); (B) * $p = 0,0349$ (vs NT-NaCl); * $p = 0,0130$ (vs NT-IBO); Número de animais 4/grupo.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar se o treinamento aeróbio (TA) prévio seria capaz de atenuar a neurotoxicidade induzida pelo ácido ibotênico (IBO) no núcleo basal de Meynert (NBM) de ratas Wistar durante o envelhecimento reprodutivo. Os dados analisados evidenciaram declínio significativo da velocidade máxima entre 21 e 25 meses nas ratas NT, refletindo comprometimento progressivo da capacidade cardiorrespiratória associado ao envelhecimento. Em contrapartida, as ratas treinadas mantiveram melhor desempenho funcional, mostrando que o treinamento físico regular promoveu benefícios sistêmicos amplos, incluindo preservação da aptidão cardiorrespiratória e maior resistência fisiológica durante o envelhecimento. De forma geral, os resultados demonstraram que o TA promoveu importante adaptação redox no hipocampo, reduziu marcadores de dano oxidativo, modulou a atividade colinérgica e favoreceu a preservação neuronal frente ao insulto excitotóxico induzido pelo IBO. Esses achados reforçam a ação do treinamento aeróbio como estratégia de pré-condicionamento neuroprotetor durante a senescência.

As análises iniciais dos marcadores de estresse oxidativo mostraram que as ratas NT, durante a periestrofpausa, apresentaram aumento basal do estresse oxidativo hipocampal, evidenciado pela elevação de PC e TBARS, associado ao aumento compensatório de antioxidantes endógenos, como GSH, SOD e GPx. Esses dados sinalizaram que no envelhecimento reprodutivo o ambiente está pró-oxidante e persistente, provavelmente relacionado à redução estrogênica, à disfunção mitocondrial (Song et al., 2024) e ao aumento da produção de EROs. Embora a ativação das defesas antioxidantes tenha ocorrido, parece não ter sido suficiente para impedir o dano oxidativo celular, especialmente no hipocampo.

Em contraste, as ratas submetidas ao TA apresentaram redução significativa dos danos oxidativos lipídicos e proteicos, concomitantemente à diminuição dos níveis de GSH, SOD e GPx. Inicialmente, a redução desses antioxidantes poderia sugerir comprometimento da defesa antioxidante, entretanto, a redução simultânea dos marcadores de dano oxidativo sinalizou o oposto. Esses resultados indicaram que o treinamento físico promoveu maior eficiência redox, reduzindo a necessidade de hiperativação compensatória do sistema antioxidante. Assim, o aumento de antioxidantes observado nas ratas NT parece refletir estado de compensação frente

ao excesso de EROs, enquanto as ratas treinadas apresentaram condição mais próxima da homeostase oxidativa. Esses achados foram reforçados pelos elevados tamanhos de efeito observados para praticamente todos os marcadores avaliados ($\eta^2_p > 0,70$), evidenciando forte influência do TA sobre o estado redox do hipocampo. Dessa forma, o TA parece ter promovido “normalização” do ambiente oxidativo hipocampal durante a periestrofa, reduzindo simultaneamente o dano molecular e a demanda antioxidante compensatória.

Esses achados estão em concordância com estudos que demonstram que o envelhecimento e a transição reprodutiva feminina estão associados ao aumento do estresse oxidativo e à redução da eficiência mitocondrial, favorecendo dano neuronal progressivo (Song et al., 2024). Em contrapartida, o exercício físico regular promove adaptações horméticas capazes de aumentar a resistência celular frente a insultos oxidativos subsequentes (Ji et al., 2010). Freitas e colaboradores (2018) demonstraram que o TA melhorou a plasticidade hipocampal e reduziu o dano oxidativo em modelos experimentais de envelhecimento. Da mesma forma, Wang e colaboradores (2024) verificaram redução de proteínas carboniladas e de produtos da peroxidação lipídica no hipocampo após treinamento físico em modelos de neurodegeneração.

O conceito de hormese parece particularmente relevante para interpretar os resultados do presente estudo (Ji et al., 2010; Clemente-Suárez et al., 2023). O exercício aeróbio aumentou transitoriamente a produção de EROs durante sua execução, entretanto, quando realizado de forma crônica e moderada, induziu adaptações celulares benéficas, aumentando a capacidade de resposta antioxidante do tecido neural (Sireno et al., 2026). Assim, o TA pode ter atuado como estímulo hormético capaz de preparar o hipocampo para enfrentar o desafio excitotóxico subsequente induzido pelo IBO. Corroborando essa hipótese, observou-se aumento significativo da TAC nas ratas treinadas. A elevação da TAC sugere modulação global da homeostase oxidativa cerebral, possivelmente relacionada ao aumento de antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico, altamente abundante no tecido encefálico e associado experimentalmente à melhora do equilíbrio redox e da função cognitiva (Freitas et al., 2018). Dessa forma, o aumento da TAC nas ratas treinadas pode representar mecanismo adicional de neuroproteção frente à excitotoxicidade.

Interessantemente, o grupo NT que recebeu infusão de IBO no NBM, também

apresentou aumento da TAC em comparação ao grupo NT-NaCl. Essa resposta sugere ativação compensatória aguda do sistema antioxidante frente ao aumento abrupto de EROs induzido pela excitotoxicidade glutamatérgica (Silvestrini e Mancini, 2024). Resultado semelhante foi observado para a GSH, cujos níveis aumentaram nas ratas NT-IBO, enquanto diminuíram nas ratas treinadas (TA-IBO). Essa diferença sugere mecanismos adaptativos distintos entre os grupos. Nas ratas NT, o aumento de GSH parece refletir resposta reativa ao dano oxidativo agudo, enquanto nas ratas TA a redução pode indicar utilização mais eficiente dos sistemas antioxidantes previamente condicionados pelo treinamento (Schmatz et al., 2012, Karthick et al., 2016).

Em relação às enzimas antioxidantes, a redução de SOD e GPx observada nas ratas treinadas também parece refletir menor necessidade de ativação compensatória. A SOD constitui a primeira linha de defesa contra o ânion superóxido, e sua hiperexpressão geralmente ocorre em ambientes com elevada geração de EROs (Yan e Spaulding, 2020). Assim, a menor atividade dessas enzimas nas ratas treinadas provavelmente indica redução da sobrecarga oxidativa cerebral. A ausência de alterações significativas da catalase reforça a hipótese de que o TA promoveu equilíbrio redox mais eficiente, sem necessidade de hiperativação antioxidante exacerbada (Xie et al., 2025). Em conjunto, esses achados sugerem que o TA de intensidade moderada e longa duração promoveu neuroproteção e fortaleceu a capacidade antioxidante do hipocampo nas roedoras senis.

Enquanto os efeitos hipocampais foram bastante evidentes, os marcadores plasmáticos apresentaram poucas alterações significantes. Esse achado pode ter ocorrido pela compartimentalização das alterações oxidativas no sistema nervoso central (SNC) (Gyurászová et al., 2018). A barreira hematoencefálica limita a passagem de diversas moléculas derivadas do SNC para a circulação periférica, fazendo com que alterações oxidativas regionais do tecido neural nem sempre sejam detectáveis no plasma (Puris et al., 2022; Ronaldson e Davis, 2024). Assim, os efeitos do IBO parecem ter permanecido predominantemente restritos ao hipocampo.

Além das alterações redox, o presente estudo demonstrou importante modulação do sistema colinérgico pelo TA. Observou-se aumento da atividade da AChE no grupo NT-IBO, enquanto as ratas treinadas expostas ao IBO apresentaram redução significativa dessa enzima. Esse resultado é de grande relevância funcional, considerando que a hiperatividade da AChE favorece degradação excessiva de ACh,

comprometendo neurotransmissão colinérgica e contribuindo para déficits cognitivos observados em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer (Akbarian et al., 2022; Sabandal et al., 2022). O estresse oxidativo exerce forte influência sobre o sistema colinérgico, uma vez que EROs podem aumentar a expressão da AChE e intensificar o comprometimento neuronal (Ghose et al., 2026). Assim, estabelece-se ciclo patológico no qual estresse oxidativo e disfunção colinérgica se potencializam mutuamente. Nesse contexto, a redução da atividade da AChE induzida pelo TA sugere preservação funcional do sistema colinérgico frente à excitotoxicidade. Esses resultados corroboram estudos prévios em modelos neurodegenerativos. Farzi et al. (2019), utilizando modelos induzidos por β -amiloide, demonstraram que o TA reduziu significativamente a atividade cerebral da AChE em comparação aos animais sedentários expostos ao peptídeo. De maneira semelhante, Cardoso et al. (2014) observaram redução da atividade da AChE em ratos hipertensos submetidos ao exercício aeróbio crônico, sugerindo maior disponibilidade de ACh em organismos previamente condicionados ao treinamento. Além disso, o exercício físico pode modular a expressão do fator de crescimento nervoso (NGF) e favorecer a sobrevivência dos neurônios colinérgicos (Ben et al., 2009). A preservação da neurotransmissão colinérgica observada no presente estudo provavelmente representa mecanismo importante da neuroproteção induzida pelo TA.

Os achados histológicos corroboram fortemente os resultados bioquímicos observados. A análise pelo método para marcação dos corpúsculos de Nissl demonstrou maior preservação neuronal nas ratas treinadas, tanto em condições fisiológicas quanto após a administração de IBO. A coloração por cresil violeta evidencia os corpúsculos de Nissl, estruturas ricas em retículo endoplasmático rugoso e ribossomos, fundamentais para síntese proteica neuronal e manutenção da viabilidade celular (Kádár et al., 2009). A preservação dessas estruturas sugere manutenção da integridade neuronal. Na região CA1, o aumento do número de neurônios Nissl-positivos no grupo TA-NaCl em relação ao NT-NaCl indica que o treinamento favoreceu maior organização celular e preservação morfológica dos neurônios hipocampus. Esses resultados estão em concordância com estudos que demonstram que o exercício físico aumenta a expressão de fatores neurotróficos, especialmente o BDNF, favorecendo neuroplasticidade, sobrevivência neuronal e fortalecimento sináptico (Garavito et al., 2025). A relação entre exercício, sistema colinérgico e BDNF também merece destaque. A atividade física aumenta a atividade

elétrica hipocampal do tipo ritmo teta, dependente de aferências colinérgicas provenientes do septo medial (Vanderwolf, 1969; Troia et al., 2025). Ademais, estudos indicam que idosos fisicamente ativos apresentam volumes cerebrais significativamente maiores em regiões temporais, como o hipocampo, quando comparados a adultos menos ativos (Cotman e Berchtold, 2002). Dessa forma, é possível que a preservação colinérgica induzida pelo TA tenha contribuído para aumento da sinalização neurotrófica e, conseqüentemente, para maior resistência neuronal observada nas ratas treinadas.

O presente estudo também demonstrou vulnerabilidade diferencial das sub-regiões hipocâmpais frente à excitotoxicidade induzida pelo IBO. O ácido ibotênico, agonista de receptores NMDA, promove influxo exacerbado de cálcio intracelular, desencadeando cascata neurodegenerativa caracterizada por disfunção mitocondrial, aumento de EROs e morte neuronal (Karthick et al., 2016). A região CA1 mostrou-se particularmente suscetível ao insulto excitotóxico, resultado compatível com a literatura (Stanika et al., 2010). Estudos demonstram que neurônios piramidais de CA1 apresentam maior sensibilidade ao excesso de glutamato e ao acúmulo intracelular de Ca^{2+} quando comparados a outras regiões hipocâmpais, como CA3 e giro denteado (Butler et al., 2010). Além disso, as mitocôndrias dos neurônios CA1 apresentaram maior susceptibilidade ao inchaço mitocondrial induzido por cálcio, favorecendo morte neuronal tardia seletiva demonstrado no estudo de Sun e colaboradores (2018). Nesse contexto, embora o grupo TA-IBO ainda tenha apresentado redução neuronal em CA1, observou-se maior preservação relativa em CA3, sugerindo que o TA prévio modulou diferencialmente a vulnerabilidade regional do hipocampo. Esses resultados reforçam a hipótese de que o treinamento físico aumenta a resiliência neuronal frente à excitotoxicidade, ainda que não elimine completamente os efeitos neurotóxicos do IBO.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o TA prévio atua como importante estratégia de pré-condicionamento neuroprotetor durante o envelhecimento. O TA promoveu adaptações redox no hipocampo, reduziu danos oxidativos, modulou de forma mais eficiente os sistemas antioxidantes e preservou a integridade neuronal frente à excitotoxicidade induzida pelo IBO. Além disso, o

treinamento aeróbio reduziu a atividade da acetilcolinesterase, sugerindo preservação funcional do sistema colinérgico mesmo diante do insulto neurotóxico. Somado a isso, a manutenção da capacidade cardiorrespiratória nos animais treinados reforça que os benefícios do treinamento aeróbio não se restringem ao SNC, mas envolvem adaptações sistêmicas relevantes para o envelhecimento saudável. Em conjunto, esses achados evidenciam que o treinamento aeróbio exerce efeito protetor amplo frente aos desafios oxidativos, excitotóxicos e degenerativos associados à senescência.

7 REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AKBARIAN, M.; MIRZAVI, F.; AMIRAHMADI, S.; HOSSEINI, M. *et al.* Amelioration of oxidative stress, cholinergic dysfunction, and neuroinflammation in scopolamine-induced amnesic rats fed with pomegranate seed. **Inflammopharmacology**, 30, n. 3, p. 1021-1035, Jun 2022.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; LING, C. Y.; KIRN, J. R. Cresyl violet: A red fluorescent Nissl stain. **J Neurosci Methods**, 33, n. 2-3, p. 129-133, Aug 1990.
- ALZHEIMER'S DISEASE FACTS AND FIGURES. **Alzheimer's Association**, 2025. Disponível em: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/facts-figures#prevalence>.
- BALOUGH, J. L.; DIPALI, S. S.; VELEZ, K.; KUMAR, T. R. *et al.* Hallmarks of female reproductive aging in physiologic aging mice. **Nat Aging**, 4, n. 12, p. 1711-1730, Dec 2024.
- BEN, J.; SOARES, F. M.; CECHETTI, F.; VUADEN, F. C. *et al.* Exercise effects on activities of Na(+),K(+)-ATPase, acetylcholinesterase and adenine nucleotides hydrolysis in ovariectomized rats. **Brain Res**, 1302, p. 248-255, Dec 11 2009.
- 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.

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

BREEZE, B.; CONNELL, E.; WILEMAN, T.; MULLER, M. *et al.* Menopause and Alzheimer's disease susceptibility: Exploring the potential mechanisms. **Brain Res**, 1844, p. 149170, Dec 01 2024.

BRICENO SILVA, G.; ARVELAEZ PASCUCCI, J.; KARIM, H.; KAUR, G.; OLIVAS LERMA, R.; MANN, A. K.; *et al.* Influence of the onset of menopause on the risk of developing Alzheimer's disease. **Cureus**, 16, n. 9, p. e69124, Sep 10 2024.

BRINTON, R. D.; YAO, J.; YIN, F.; MACK, W. J. *et al.* Perimenopause as a neurological transition state. **Nat Rev Endocrinol**, 11, n. 7, p. 393-405, Jul 2015.

BUTLER, T. R.; SELF, R. L.; SMITH, K. J.; SHARRETT-FIELD, L. J. *et al.* Selective vulnerability of hippocampal cornu ammonis 1 pyramidal cells to excitotoxic insult is associated with the expression of polyamine-sensitive N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptors. **Neuroscience**, 165, n. 2, p. 525-534, Jan 20 2010.

BUEGE, J. A; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, v. 52, p. 302 – 310, 1978.

CAO, Y.; LIU, P.; BIAN, H.; JIN, S. *et al.* Reduced neurogenesis in human hippocampus with Alzheimer's disease. **Brain Pathol**, 34, n. 3, p. e13225, May 2024.

CARDOSO, A. M.; ABDALLA, F. H.; BAGATINI, M. D.; MARTINS, C. C. *et al.* Swimming training prevents alterations in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in hypertensive rats. **Am J Hypertens**, 27, n. 4, p. 522-529, Apr 2014.

CASTRO, B. M. D. Determinação da participação do transportador vesicular de acetilcolina em funções cognitivas através do uso de camundongos geneticamente modificados. Repositório. Universidade Federal de Minas Gerais/ Instituto de Ciências

Biológicas, 2009.

CHEN, Z. R.; HUANG, J. B.; YANG, S. L.; HONG, F. F. Role of Cholinergic Signaling in Alzheimer's Disease. **Molecules**, 27, n. 6, Mar 10 2022.

CLEMENTE-SUÁREZ, V. J.; BUSTAMANTE-SANCHEZ, Á.; MIELGO-AYUSO, J.; MARTÍNEZ-GUARDADO, I. *et al.* Antioxidants and Sports Performance. **Nutrients**, 15, n. 10, May 18 2023.

COTMAN, C. W.; BERCHTOLD, N. C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 295–301, 2002.

CONLEY, A. C.; VEGA, J. N.; JOHNSON, J. V.; DUMAS, J. A. *et al.* Effect of estradiol with or without micronized progesterone on cholinergic-related cognitive performance in postmenopausal women. **Front Neurosci**, 18, p. 1428675, 2024.

CUESTAS TORRES, D. M.; CARDENAS, F. P. Synaptic plasticity in Alzheimer's disease and healthy aging. *Rev Neurosci*, 31, n. 3, p. 245-268, Apr 28 2020.

CUNNINGHAM, A.C., HEWINGS-MARTIN, Y., WICKHAM, A.P., PRENTICE, C., ZHAUNOVA, L. Perimenopause symptoms, severity, and healthcare seeking in women in the US. **npj Womens Health** 3, 12, Feb. 2025.

DARE, L. R.; GARCIA, A.; SOARES, C. B.; LOPES, L. *et al.* The Reversal of Memory Deficits in an Alzheimer's Disease Model Using Physical and Cognitive Exercise. **Front Behav Neurosci**, 14, p. 152, 2020.

DE LA ROSA, A.; OLASO-GONZALEZ, G.; ARC-CHAGNAUD, C.; MILLAN, F. *et al.* Physical exercise in the prevention and treatment of Alzheimer's disease. **J Sport Health Sci**, 9, n. 5, p. 394-404, Sep 2020.

DHAPOLA, R.; BEURA, S. K.; SHARMA, P.; SINGH, S. K. *et al.* Oxidative stress in Alzheimer's disease: current knowledge of signaling pathways and therapeutics. **Mol Biol Rep**, 51, n. 1, p. 48, Jan 02 2024.

DOS SANTOS SILVA, R.A., PERES-UENO, M.J., NICOLA, A.C. *et al.* The

microarchitecture and chemical composition of the femur neck of senile female rats after different physical training protocols. **GeroScience** 46, 1927–1946 (2024).

DISHMAN, R. K.; R.B.ARMSTRONG; M.D.DELP; R.E.GRAHAM; A.L.DUNN. Open-Field Behavior is not Related to Treadmill Performance in Exercising Rats. **Physiology & Behavior**, v. 43, n. 5, p. 541–546, 1988.

DUMAS, J. A.; TESTO, A.; MILLER, A. S.; OZAH, A. *et al.* Oral Choline Reduced Working Memory-Related Brain Activation in Postmenopausal Women: A Pilot Study. **Nutrients**, 18, n. 3, Jan 30 2026.

DUZEL, E.; VAN PRAAG, H.; SENDTNER, M. Can physical exercise in old age improve memory and hippocampal function? **Brain**, 139, n. Pt 3, p. 662-673, Mar 2016.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, 7, n. 2, p. 88-95, Jul 1961.

FARZI, M. A.; SADIGH-ETEGHAD, S.; EBRAHIMI, K.; TALEBI, M. Exercise Improves Recognition Memory and Acetylcholinesterase Activity in the Beta Amyloid-Induced Rat Model of Alzheimer's Disease. **Ann Neurosci**, 25, n. 3, p. 121-125, Jan 2019.

FERREIRA, L. B. *et al.* Activity of neurons in the preoptic area and their participation in reproductive senescence: Preliminary findings. **Experimental Gerontology**, v. 72, p. 157-161, 2015.

FREITAS, D. A.; ROCHA-VIEIRA, E.; SOARES, B. A.; NONATO, L. F. *et al.* High intensity interval training modulates hippocampal oxidative stress, BDNF and inflammatory mediators in rats. **Physiol Behav**, 184, p. 6-11, Feb 01 2018.

GHOSE, A; PAIDSETTY, SK; PRUSTY, SK. *et al.* Synthetic modulators of acetylcholinesterase: mechanistic, SAR, and therapeutic perspectives in Alzheimer's disease. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 30, art. 25, 2026.

GOSHADROU, F.; SADEGHI, B. Nucleus basalis of Meynert modulates signal

processing in rat layer 5 somatosensory cortex but leads to memory impairment and tactile discrimination deficits following lesion. **Behav Brain Res**, 386, p. 112608, May 27 2020.

GYURÁSZOVÁ, M.; KOVALČÍKOVÁ, A.; JANŠÁKOVÁ, K.; ŠEBEKOVÁ, K. *et al.* Markers of oxidative stress and antioxidant status in the plasma, urine and saliva of healthy mice. **Physiol Res**, 67, n. 6, p. 921-934, Dec 18 2018.

HALL, J. M.; SAVAGE, L. M. Exercise leads to the re-emergence of the cholinergic/nestin neuronal phenotype within the medial septum/diagonal band and subsequent rescue of both hippocampal ACh efflux and spatial behavior. **Exp Neurol**, 278, p. 62-75, Apr 2016.

HARLOW, S. D.; GASS, M.; HALL, J. E.; LOBO, R. *et al.* Executive summary of the Stages of Reproductive Aging Workshop + 10: addressing the unfinished agenda of staging reproductive aging. **Menopause**, 19, n. 4, p. 387-395, Apr 2012.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal Biochem**, 48, n. 2, p. 422-427, Aug 1972.

HERNÁNDEZ-ÁLVAREZ, D.; ROSADO-PÉREZ, J.; GAVIA-GARCÍA, G.; ARISTA-UGALDE, T. L. *et al.* Aging, Physical Exercise, Telomeres, and Sarcopenia: A Narrative Review. **Biomedicines**, 11, n. 2, Feb 17 2023.

HOSSEINI, N.; ALAEI, H.; REISI, P.; RADAHMADI, M. The effects of NBM lesion on synaptic plasticity in rats. **Brain Res**, 1655, p. 122-127, Jan 15 2017.

JI, L. L.; DICKMAN, J. R.; KANG, C.; KOENIG, R. Exercise-induced hormesis may help healthy aging. **Dose Response**, 8, n. 1, p. 73-79, Jan 28 2010.

KÁDÁR, A.; WITTMANN, G.; LIPOSITS, Z.; FEKETE, C. Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. **J Neurosci Methods**, 184, n. 1, p. 115-118, Oct 30 2009.

KARTHICK, C.; PERIYASAMY, S.; JAYACHANDRAN, K. S.; ANUSUYADEVI, M. Intrahippocampal Administration of Ibotenic Acid Induced Cholinergic Dysfunction via

NR2A/NR2B Expression: Implications of Resveratrol against Alzheimer Disease Pathophysiology. **Front Mol Neurosci**, 9, p. 28, 2016.

KILIMANN, I.; GROTHE, M.; HEINSEN, H.; ALHO, EJ *et al.* Subregional atrophy of the basal forebrain in Alzheimer's disease: a multicenter study. **J Alzheimer Dis**, 40, n. 3, pág. 687-700, 2014.

KUHN, J.; HARDENACKE, K.; LENARTZ, D.; GRUENDLER, T. *et al.* Deep brain stimulation of the nucleus basalis of Meynert in Alzheimer's dementia. **Mol Psychiatry**, 20, n. 3, p. 353-360, Mar 2015.

LONG, J. A.; EVANS, H. M. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. **Memoirs of the University of California**. 1922.

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

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, June 1974.

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, Aug. 2014.

MITSUSHIMA, D.; TAKASE, K.; FUNABASHI, T.; KIMURA, F. Gonadal steroids maintain 24 h acetylcholine release in the hippocampus: organizational and activational effects in behaving rats. **J Neurosci**, 29, n. 12, p. 3808-3815, Mar 25 2009.

MORRIS, J. K.; VIDONI, E. D.; JOHNSON, D. K.; VAN SCIVER, A. *et al.* Aerobic exercise for Alzheimer's disease: A randomized controlled pilot trial. **PLoS One**, 12, n. 2, p.170547, 2017.

MOSCONI, L.; BERTI, V.; DYKE, J.; SCHELBAUM, E. *et al.* Menopause impacts

human brain structure, connectivity, energy metabolism, and amyloid-beta deposition. **Sci Rep**, 11, n. 1, p. 10867, Jun 09 2021.

MUFSON, E. J.; MAHADY, L.; WATERS, D.; COUNTS, S. E. *et al.* Hippocampal plasticity during the progression of Alzheimer's disease. **Neuroscience**, 309, p. 51-67, Nov 19 2015.

NEMY, M.; DYRBA, M.; BROSSERON, F.; BUERGER, K. *et al.* Cholinergic white matter pathways along the Alzheimer's disease continuum. **Brain**, 146, n. 5, p. 2075-2088, May 02 2023.

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, 2016.

NOKIA, M.S.; LENSU, S.; AHTIAINEN, J.P.; JOHANSSON, P.P. *et al.* Physical exercise increases adult hippocampal neurogenesis in male rats provided it is aerobic and sustained. **The Journal of Physiology**, 594, n. 7, p. 1855–1873, 2016.

OPENDAK, M.; GOULD, E. Adult neurogenesis: a substrate for experience-dependent change. **Trends Cogn Sci**, 19, n. 3, p. 151-161, Mar 2015.

ORCIANI, C.; HALL, H.; PENTZ, R.; FORET, M. K. *et al.* Long-term nucleus basalis cholinergic depletion induces attentional deficits and impacts cortical neurons and BDNF levels without affecting the NGF synthesis. **J Neurochem**, 163, n. 2, p. 149-167, Oct 2022.

OSWAL, A.; GRATWICKE, J.; AKRAM, H.; JAHANSHAH, M. *et al.* Cortical connectivity of the nucleus basalis of Meynert in Parkinson's disease and Lewy body dementias. **Brain**, 144, n. 3, p. 781-788, Apr 12 2021.

PEÑALVA, D. A.; MUNAFÓ, J. P.; ANTOLLINI, S. S. Cholesterol's role in membrane organization and nicotinic acetylcholine receptor function: Implications for aging and Alzheimer's disease. **Chem Phys Lipids**, 269, p. 105484, Jul 2025.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2007.

PICOLI, C. DE C. et al. Peak Velocity as an Alternative Method for Training Prescription in Mice. **Frontiers in Physiology**, v. 9, 6 fev. 2018.

PURIS, E.; FRICKER, G.; GYNTER, M. Targeting Transporters for Drug Delivery to the Brain: Can We Do Better? **Pharm Res**, 39, n. 7, p. 1415-1455, Jul 2022.

QUERFURTH, H. W.; LAFERLA, F. M., Mechanisms of disease: Alzheimer's disease. **New England Journal of Medicine**, 2010, 362 (4), 329-344.

RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Front Neuroendocrinol**, 35, n. 1, p. 8-30, Jan 2014.

ROGOZINSKI, S.; KLIETZ, M.; RESPONDEK, G.; OERTEL, W. H. et al. Reduction in Volume of Nucleus Basalis of Meynert Is Specific to Parkinson's Disease and Progressive Supranuclear Palsy but Not to Multiple System Atrophy. **Front Aging Neurosci**, 14, p. 851788, 2022.

ROMERO GARAVITO, A.; DÍAZ MARTÍNEZ, V.; JUÁREZ CORTÉS, E.; NEGRETE DÍAZ, J. V.; MONTILLA RODRÍGUEZ, L. M. Impact of physical exercise on the regulation of brain-derived neurotrophic factor in people with neurodegenerative diseases. **Front Neurol**, 15, p. 1505879, Jan 28 2025.

RONALDSON, P. T.; DAVIS, T. P. Blood-brain barrier transporters: a translational consideration for CNS delivery of neurotherapeutics. **Expert Opin Drug Deliv**, 21, n. 1, p. 71-89, 2024.

SABANDAL, P. R.; SALDES, E. B.; HAN, K. A. Acetylcholine deficit causes dysfunctional inhibitory control in an aging-dependent manner. **Sci Rep**, 12, n. 1, p. 20903, Dec 03 2022.

SALTA, E.; LAZAROV, O.; FITZSIMONS, C. P.; TANZI, R. et al. Adult hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease: A roadmap to clinical relevance. **Cell Stem Cell**, 30, n. 2, p. 120-136, Feb 02 2023.

SCHMATZ, R.; PERREIRA, L. B.; STEFANELLO, N.; MAZZANTI, C. *et al.* Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats. **Biochimie**, 94, n. 2, p. 374-383, Feb 2012.

SHAFIEE, N.; FONOV, V.; DADAR, M.; SPRENG, R. N. *et al.* Degeneration in Nucleus basalis of Meynert signals earliest stage of Alzheimer's disease progression. **Neurobiol Aging**, 139, p. 54-63, Jul 2024.

SHARMA, V. K.; SINGH, T. G.; SINGH, S.; GARG, N. *et al.* Apoptotic Pathways and Alzheimer's Disease: Probing Therapeutic Potential. **Neurochem Res**, 46, n. 12, p. 3103-3122, Dec 2021.

SILVESTRINI, A.; MANCINI, A. The Double-Edged Sword of Total Antioxidant Capacity: Clinical Significance and Personal Experience. **Antioxidants (Basel)**, 13, n. 8, Aug 01 2024.

SIRENO, L.; DIMAURO, I.; CAPOROSSI, D. Reactive oxygen species in exercise biology: from adaptive stress response to cell signaling and beyond. **Free Radic Biol Med**, 245, p. 447-462, Mar 01 2026.

SONG J, XIAO L, ZHANG Z, WANG Y, KOUIS P, RASMUSSEN LJ, DAI F. Effects of reactive oxygen species and mitochondrial dysfunction on reproductive aging. **Front Cell Dev Biol**. 12:1347286, 2024.

STANIKA, R. I.; WINTERS, C. A.; PIVOVAROVA, N. B.; ANDREWS, S. B. Differential NMDA receptor-dependent calcium loading and mitochondrial dysfunction in CA1 vs. CA3 hippocampal neurons. **Neurobiol Dis**, 37, n. 2, p. 403-411, Feb 2010.

SUN, C.; FUKUSHI, Y.; WANG, Y.; YAMAMOTO, S. Astrocytes Protect Neurons in the Hippocampal CA3 Against Ischemia by Suppressing the Intracellular Ca. **Front Cell Neurosci**, 12, p. 280, 2018.

TAMAGNO, E.; GUGLIELMOTTO, M.; VASCIAVEO, V.; TABATON, M. Oxidative Stress and Beta Amyloid in Alzheimer's Disease. Which Comes First: The Chicken or

the Egg? **Antioxidants (Basel)**, 10, n. 9, Sep 16 2021.

TROÌA, L.; GARASSINO, M.; VOLPICELLI, A. I.; FORNARA, A. *et al.* Sleep Disturbance and Perimenopause: A Narrative Review. **J Clin Med**, 14, n. 5, Feb 23 2025.

TWAROWSKI, B.; HERBET, M. Inflammatory Processes in Alzheimer's Disease-Pathomechanism, Diagnosis and Treatment: A Review. **Int J Mol Sci**, 24, n. 7, Mar 30 2023.

VANDERWOLF, C. H. Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 26, n. 4, p. 407–418, 1969.

VECCHIO, L. M.; MENG, Y.; XHIMA, K.; LIPSMAN, N. *et al.* The Neuroprotective Effects of Exercise: Maintaining a Healthy Brain Throughout Aging. **Brain Plast**, 4, n. 1, p. 17-52, Dec 12 2018.

VILLASECA, P.; CISTERNAS, P.; INESTROSA, N. C. Menopause and development of Alzheimer's disease: Roles of neural glucose metabolism and Wnt signaling. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 13, p. 1021796, 2022.

WANG, S.; ZHOU, Y.; WU, Y.; LANG, Y. *et al.* Long-term aerobic exercise improves learning memory capacity and effects on oxidative stress levels and Keap1/Nrf2/GPX4 pathway in the hippocampus of APP/PS1 mice. **Front Neurosci**, 18, p. 1505650, 2024.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325 – 333, 1981.

XIE, Y.; GU, Y.; LI, Z.; ZHANG, L. *et al.* Effects of exercise on different antioxidant enzymes and related indicators: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Sci Rep**, 15, n. 1, p. 12518, Apr 11 2025.

YAN, Z.; SPAULDING, H. R. Extracellular superoxide dismutase, a molecular transducer of health benefits of exercise. **Redox Biol**, 32, p. 101508, May 2020.

ZHAO, Y.; ZHAO, B. Oxidative stress and the pathogenesis of Alzheimer's disease. **Oxid Med Cell Longev**, 2013, p. 316523, 2013.

ZHANG, S.; ZHEN, K.; SU, Q.; CHEN, Y. et al. The Effect of Aerobic Exercise on Cognitive Function in People with Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Int J Environ Res Public Health**, 19, n. 23, Nov 25 2022.

ZONG, B.; YU, F.; ZHANG, X.; ZHAO, W. et al. Understanding How Physical Exercise Improves Alzheimer's Disease: Cholinergic and Monoaminergic Systems. **Front Aging Neurosci**, 14, p. 869507, 2022.

ANEXO A – Comitê de Ética




UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeitos do treinamento aeróbio em ratas senescentes submetidas a administração de ácido ibotênico do Núcleo Basal de Meynert"**, Processo FOA nº 1029-2023, sob responsabilidade de Rita Cassia Menegati Domelles apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Janeiro de 2024.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Janeiro de 2027.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Fevereiro de 2027.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effects of aerobic trainigin senescent rats submitted to administration of ibotenic acid in the Basal Nucleus of Meynert"**, Protocol FOA nº 1029-2023, under the supervision of Rita Cassia Menegati Domelles presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on January 24, 2024.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: January 01, 2027.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: February 01, 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, 1103 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (18) 3636-3234 Email: CEUA: ceua.foa@unesp.br