

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

ELZA MARIA SANTOS DA SILVEIRA

**EFEITOS DA IDADE E DO EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE
SOBRE MARCHA E EQUILÍBRIO E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO
NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS**

TESE DE DOUTORADO

PORTO ALEGRE

2019

ELZA MARIA SANTOS DA SILVEIRA

**EFEITOS DA IDADE E DO EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE
SOBRE MARCHA E EQUILÍBRIO E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO
NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS**

**Tese apresentada ao programa de Pós-
graduação em Ciências Biológicas:
Fisiologia, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para a obtenção do título de
doutor em Fisiologia**

Orientadora: Prof. Dra. Wania A. Partata

PORTO ALEGRE

2019

ELZA MARIA SANTOS DA SILVEIRA

**EFEITOS DA IDADE E DO EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE
SOBRE MARCHA E EQUILÍBRIO E PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO
NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Fisiologia

Orientadora: Prof. Dra. Wania A. Partata

Banca Examinadora: DRA. MARIA AMÁLIA PAVANATO - UFSM

DRA. TAIS MALYSZ - UFRGS

DR. CARLOS ALEXANDRE NETTO – UFRGS

DR. MAURÍCIO DA SILVA KRAUSE - UFRGS (RELATOR)

AGRADECIMENTOS

Durante muito tempo cultivei o sonho de realizar o doutorado e me tornar pesquisadora. Sempre quis contribuir para melhora na qualidade de vida das pessoas e essa escolha me conduziu a um caminho cheio de desafios, no qual fui me apaixonando. Essa conquista não seria possível se não fosse por vários fatores e pessoas, tais como:

Pela oportunidade de estudar em uma Universidade Federal (UFRGS), na qual tenho muito orgulho de fazer parte, e pelo CNPQ, que concedeu a bolsa de estudos.

Por ter tido o privilégio de ser orientada pela Professora Wania A. Partata, que me aceitou como aluna e esteve sempre presente de forma incansável em todos os momentos desse processo, ensinando, ajudando e orientando. Uma pesquisadora ética, competente e uma mulher brilhante. Professora Wania... te admiro muito e obrigada por tudo!

Agradeço ao esposo da Professora Wania, Seu Marcos, que prontamente auxiliou na confecção do aparato para os treinos dos animais.

Agradeço aos colegas que fazem parte da equipe do Laboratório de Neurobiologia comparada, especialmente Adarly, Maria, Ana Paula, Thaisla, por auxiliarem nas técnicas, pela parceria e colaboração. Lembrarei com muito carinho e saudade deste laboratório.

Agradeço aos colegas que foram se tornando meus amigos com a convivência e me proporcionando ótimos momentos de descontração, como é o caso do Francisco e da Clívia, especialmente Clívia que tem estado presente sendo meu “ombro amigo”.

Às queridas professoras Denise Zancan e Renata Rossat, sempre prestativas e à Angela Kolberg pela amizade e por estar presente em várias etapas do doutorado.

Aos técnicos da UFRGS, especialmente Cláudia Almeida, cuidando sempre com zelo das amostras, e Eliane Borges.

Aos Laboratórios de Metabolismo, Fisiologia Cardiovascular, Fisiologia Celular, Microbiologia, Parasitologia e Imunologia, especialmente Professores Márcia Trapp, Luciano S. de Fraga, Adriane Bello-Klein, Paulo Ivo Homem de Bittencout, Marilisi Brittes Rott, Roselis Silveira Martins da Silva, Luis Kucharski, e suas equipes, que sempre foram prestativos nos empréstimos de materiais, auxílio em técnicas e por compartilhar o conhecimento.

Aos demais professores do PPG em Fisiologia e de outros programas nos quais colaboraram para realização do projeto.

Ao veterinário Andre Luis Lucero Batista e aos bioteristas que cuidaram dos animais, avisando sempre quando havia qualquer intercorrência.

Aos funcionários do PPG em Fisiologia e aos funcionários do ICBS.

Agradeço a paciência e o apoio da minha mãe Sonia e meu filho Juliano, que todos os dias me motivavam e que jamais deixaram a “peteca cair” nem nos piores momentos. Vocês não tem ideia o quanto sou grata e de como são importantes na minha vida. Amo muito vocês! Ju, meu filho, obrigada por estar sempre me apoiando.

Meus irmãos amados Sonia Walkiria e André Luís juntamente com minha amadinha Giovana, meus cunhados queridos Patrícia e Pedro, obrigada pelo incentivo.

Agradeço meus tios, primos, pelo carinho de sempre, e demais familiares.

Aos meus queridos pacientes e colegas de trabalho, por entender o quanto o doutorado é importante para mim, e mesmo com várias alterações na agenda sempre prestigiaram o meu trabalho.

Aos meus amigos e a todos aqueles que não citei, mas que contribuíram para que o projeto chegasse ao final com êxito.

Muito obrigada!

“A vida não é fácil para nenhum de nós. Mas e daí? Temos que ter perseverança e acima de tudo, confiança em nós mesmos”.

Marie Curie

APRESENTAÇÃO

Esta tese teve como objetivo geral avaliar os efeitos do envelhecimento e do exercício físico regular, de baixa intensidade, em esteira, sobre: 1) equilíbrio e parâmetros da marcha; e 2) biomarcadores oxidativos em medula espinal, tronco encefálico, cerebelo e córtex cerebral em ratos Wistar machos.

A tese está estruturada em nove capítulos, onde inicialmente se apresenta a introdução ao tema, que está organizada em quatro subitens de revisão bibliográfica, que abordam os achados relativos ao tema, provenientes da literatura científica atual. Em seguida, é apresentada a hipótese, seguida do objetivo do estudo, que está dividido em dois subitens, o primeiro mostrando o objetivo geral da tese e o segundo, os objetivos específicos. O quarto capítulo contém os materiais e métodos, onde está descrito em detalhes todos os procedimentos realizados ao longo do estudo. No capítulo cinco estão apresentados os resultados na forma de um artigo científico e um manuscrito, os quais mostram os materiais e métodos utilizados e os resultados obtidos em cada um dos estudos.

O artigo apresenta os efeitos da idade e do exercício regular de baixa intensidade sobre parâmetros do passo e equilíbrio, e biomarcadores oxidativos em medula espinal de ratos Wistar. Nesse artigo são apresentados ainda os efeitos da idade e do exercício sobre alterações no peso corporal e valores plasmáticos de glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL colesterol. O artigo também apresenta o efeito da idade e do exercício de baixa intensidade sobre a relação entre peso do músculo sóleo e peso corporal, usado como indicador de perda de massa muscular esquelética, e correlação entre essa relação e a variação no peso corporal induzida pelo envelhecimento. Este artigo foi publicado na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (2019).

O manuscrito apresenta o efeito da idade e do exercício regular de baixa intensidade sobre valores de tióis totais, capacidade antioxidante total, atividade da enzima superóxido dismutase e hidroperóxidos lipídicos em regiões encefálicas como córtex cerebral, cerebelo e tronco encefálico. O artigo apresenta ainda os efeitos da idade e do exercício sobre medidas radiográficas feitas no osso fêmur. Este artigo está submetido à avaliação na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.

O capítulo seis compreende a discussão, onde os principais resultados dos dois artigos científicos são discutidos em conjunto, amparados por achados da literatura. No

sétimo capítulo são apresentadas as conclusões possíveis até o momento deste trabalho de doutorado. No capítulo seguinte estão as perspectivas de futuros estudos sobre o tema da tese. No último capítulo encontram-se as referências bibliográficas dos textos científicos consultados apenas para a redação dos capítulos Introdução, Material e Métodos e Discussão. As referências bibliográficas dos artigos científicos são apresentadas ao final de cada artigo.

RESUMO

É sabido que o avanço da idade aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminui antioxidantes no sistema nervoso central (SNC). São desconhecidas essas alterações no SNC de ratos Wistar com idades intermediárias e muito avançadas. Uma estratégia benéfica para envelhecimento com qualidade de vida é o exercício físico. Porém, se desconhece os efeitos do exercício de baixa intensidade sobre ROS no SNC. Este trabalho avaliou os efeitos do envelhecimento e do exercício físico regular de baixa intensidade em esteira sobre: equilíbrio e passo, biomarcadores oxidativos em medula espinal, tronco encefálico, cerebelo e córtex cerebral, e perda de massa muscular esquelética e aspecto radiográfico do osso fêmur, em ratos Wistar machos com diferentes idades. O peso corporal aumentou até 24 meses, e diminuiu aos 30 meses, idade onde a glicemia reduziu e colesterol total e HDL colesterol aumentaram. O indicador de perda de massa muscular (peso do músculo sóleo/peso corporal) diminuiu aos 24 e 30 meses. Os comprimentos da passada e do passo aumentaram até 18 meses, mas reduziram aos 24 e 30 meses. O envelhecimento aumentou a largura do passo, reduziu o índice funcional do nervo isquiático (IFI), e aumentou o número de deslizos e o tempo gasto para atravessar a barra estreita, teste que avalia o equilíbrio. Na medula espinal, a geração de ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, capacidade antioxidante total (TAC), e atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) aumentaram, enquanto o conteúdo de tióis totais reduziu e os hidroperóxidos lipídicos permaneceram inalterados. No encéfalo se observou: aumento nos hidroperóxidos lipídicos em tronco encefálico e cerebelo aos 30 meses; aumento na TAC no tronco encefálico aos 24 e 30 meses; redução no conteúdo de tióis totais em tronco encefálico, cerebelo e córtex cerebral; sem mudanças na SOD. No fêmur, o envelhecimento aumentou o comprimento e a largura, a espessura da cortical, promoveu esclerose na cortical e medular, aumentou a radioluscência, radiopacidade e remodelamento de pescoço femoral, deformidade óssea, e osteófito. O exercício não mudou peso corporal, indicador de perda de massa muscular esquelética, comprimentos da passada e do passo, largura do passo, IFI, e parâmetros oxidativos em medula espinal. Porém, o exercício reduziu o número de deslizos e o tempo gasto na travessia da barra estreita, aumentou hidroperóxidos lipídicos em tronco encefálico aos 6 e 18 meses e diminuiu aos 24 meses, reduziu o conteúdo de tióis totais no tronco encefálico aos 6 meses, a TAC em córtex cerebral aos 24 meses, e a atividade da SOD em cerebelo aos 6 e 18 meses. O exercício ainda reduziu a radioluscência e a esclerose na cavidade medular. Apesar de o estudo ter limitações (número pequeno de ratos por grupo), os resultados em conjunto seguem na direção de efeito benéfico do exercício de baixa intensidade durante o envelhecimento. Nesse contexto, os resultados do presente estudo reforçam o uso desse tipo de exercício como estratégia para envelhecimento com qualidade de vida.

Palavras-chave: Envelhecimento. Sarcopenia. Raio-X do fêmur. Espécies reativas de oxigênio. Quedas em idosos. Alterações no passo.

ABSTRACT

Advancing age increases the formation of reactive oxygen species (ROS) and decreases central nervous system (CNS) antioxidants. These changes in the CNS of Wistar rats with intermediate and very advanced age are unknown. A beneficial strategy for aging with quality of life is exercise. However, there is a lack of knowledge about the effects of low intensity exercise on ROS in the CNS. This study evaluated the effects of exercise and regular low-intensity treadmill exercise on: balance and stride, oxidative biomarkers in the spinal cord, brainstem, cerebellum and cerebral cortex, in addition to skeletal muscle mass loss and radiographic aspect of the femur, in male Wistar rats with different ages. Body weight increased up to 24 months, and decreased at 30 months, age in which blood glucose decreased and total cholesterol and HDL cholesterol increased. The indicator of muscle mass loss (soleus muscle weight / body weight) decreased at 24 and 30 months of age. Stride and step lengths increased up to 18 months but reduced at 24 and 30 months of age. Aging increased the stride width, reduced the sciatic nerve functional index (SFI), and increased the number of slips and time spent crossing the narrow bar, a test that assesses balance. In the spinal cord, generation of superoxide anion, hydrogen peroxide, total antioxidant capacity (TAC), and the activity of the antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) increased, while total thiol content decreased and lipid hydroperoxides remained unchanged. In the brain we observed: increase in lipid hydroperoxides in brainstem and cerebellum at 30 months; increased brainstem TAC at 24 and 30 months; reduction in total thiols content in brainstem, cerebellum and cerebral cortex; no changes in the SOD. In the femur, aging increased length and width, cortical thickness, promoted cortical and medullary sclerosis, increased radiolucency, radiopacity and remodeling of the femoral neck, bone deformity, and osteophyte. Exercise did not alter body weight, indicator of skeletal muscle loss, stride and step lengths, stride width, SFI, and spinal cord oxidative parameters. However, exercise reduced the number of slips and time spent crossing the narrow bar, increased brainstem lipid hydroperoxides at 6 and 18 months and decreased it at 24 months, reduced total brain thiol content at 6 months, TAC in the cerebral cortex at 24 months, and cerebellar SOD activity at 6 and 18 months of age. Exercise further reduced radiolucency and sclerosis in the medullary cavity. Although the study has limitations (small number of rats per group), the results together go towards the beneficial effect of low intensity exercise during aging. In this context, the results of the present study reinforce the use of this type of exercise as a strategy for aging with quality of life.

Keywords: Aging. Sarcopenia. Femur X-Ray. Reactive oxygen species. Falls in the elderly. Changes in stride.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Fotografia de rato Wistar com suas patas dianteiras sobre o tubo plástico atóxico (Relax[®]).....pg.17
- FIGURA 2: Fotografia da esteira ergométrica adaptada para uso em ratos.....pg.19
- FIGURA 3: Esquema mostrando os dias dos testes funcionais (teste da barra estreita e teste de marcação das patas); realização do protocolo de exercício físico, e morte dos animais para coleta dos tecidos.....pg.20
- FIGURA 4: Fotografia do aparato usado no teste de marcação das patas.....pg.21
- FIGURA 5: Esquemas de pegadas de ratos obtidas no teste de marcação das patas.....pg.22
- FIGURA 6: Fotografia mostrando o aparato usado no teste da barra estreita.....pg.24
- FIGURA 7: Radiografias do osso fêmur de rato Wistar adulto, em vista lateral (a) e frontal (b), em direções dorsoventrais.....pg.29
- FIGURA 8: Esquema mostrando breve resumo dos resultados do presente trabalho referentes aos parâmetros do passo e equilíbrio, biomarcadores oxidativos no sistema nervoso central e alterações no osso fêmur de ratos sedentários e exercitados.....pg.96

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 1

- FIGURA 1: Peso corporal de ratos Wistar de 3, 6, 18, 24 e 30 meses de idade e o efeito de 12 semanas de corrida em esteira (exercício) sobre este ganho em ratos de 6, 18 e 24 meses de idade.....pg.37
- FIGURA 2: Medidas em plasma de glicose (A), triglicerídeos (B), colesterol total (C) e HDL colesterol (D) de ratos Wistar com diferentes idades.....pg.37
- FIGURA 3: Relação entre peso do músculo sóleo (mg) e peso corporal (g) de ratos Wistar de diferentes idades.....pg.38
- FIGURA 4: Medidas dos comprimentos da passada (A) e do passo (B), largura do passo (C) e índice funcional do nervo isquiático (D) de ratos Wistar de diferentes idades.....pg.39
- FIGURA 5: Medidas dos comprimentos da passada (A) e do passo (B), largura do passo (C) e índice funcional do nervo isquiático (D) de ratos Wistar de diferentes idades após 12 semanas de corrida em esteira.....pg.40
- FIGURA 6: Respostas ao teste de equilíbrio na barra estreita em termos de escores (A,C) e tempo total gasto na travessia da barra (B,D) de ratos Wistar de diferentes idades (A,B) e após 12 semanas de corrida em esteira (C,D).....pg.40

- FIGURA 7: Conteúdo de tióis totais (A,D), capacidade antioxidante total (B,E) e atividade da superóxido dismutase (C,F) em medula espinal de ratos Wistar de diferentes idades (A-C) e após 12 semanas de corrida em esteira (D-F).....pg.41
- FIGURA 8: Geração de ânion superóxido (A,D), peróxido de hidrogênio (B,E) e hidroperóxidos lipídicos (C,F) em medula espinal de ratos Wistar de diferentes idades (A-C) e após 12 semanas de corrida em esteira (D-F).....pg.42

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 2

- FIGURA 1: Imagem radiográfica de uma vista lateral do osso femoral de rato Wistar..pg.75
- FIGURA 2: Valores de hidroperóxidos lipídicos em tronco encefálico (A), cerebelo (B) e córtex cerebral (C) de ratos Wistar de diferentes idades (A-C) e após 12 semanas de corrida em esteira (D-F).....pg.76
- FIGURA 3: Valores da capacidade antioxidante total em tronco encefálico (A), cerebelo (B) e córtex cerebral (C) de ratos Wistar de diferentes idades (A-C) e após 12 semanas de corrida em esteira (D-F).....pg.77
- FIGURA 4: Conteúdo de tióis totais em tronco encefálico (A), cerebelo (B) e córtex cerebral (C) de ratos Wistar de diferentes idades (A-C) e após 12 semanas de corrida em esteira (D-F).....pg.78
- FIGURA 5: Atividade da enzima superóxido dismutase em tronco encefálico (A), cerebelo (B) e córtex cerebral (C) de ratos Wistar de diferentes idades (A-C) e após 12 semanas de corrida em esteira (D-F).....pg.79
- FIGURA 6: Comprimento (A) e largura (B) do osso fêmur de ratos Wistar de diferentes idades e após 12 semanas de corrida em esteira (C,D).....pg.80
- FIGURA 7: Espessura do osso cortical em seu aspecto medial (A) e lateral (B), e espessura total da cortical (C) e largura da cavidade medular (D) do osso fêmur de ratos Wistar de diferentes idades e após 12 semanas de corrida em esteira (C,D).....pg.81

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Medidas radiográficas de fêmur de ratos Wistar de diferentes idades.....pg.82

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS⁺ – 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato)

ANOVA – análise de variância

ATP – trifosfato de adenosina

BHT – butil-hidroxitolueno

CREAL – centro de reprodução e experimentação de animais de laboratório

CONSEA- Conselho Nacional de controle e experimentação animal

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DAB – 3-3' diaminobenzidina

DRG – gânglio da raiz dorsal

DTNB – ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzóico)

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe⁺²: ferro no estado ferroso

Fe⁺³: ferro no estado férrico

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

HDL- lipoproteína de alta densidade (do inglês *High DensityLipoproteins*)

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICBS- Instituto de Ciências Básicas da Saúde

IFI – índice funcional do isquiático

IL – interleucina

IT- Distância do 2° ao 4° dedo

IP3 – inositol-trifosfato

KCl – cloreto de potássio

L – esquerdo (do inglês left)

LOOH – hidroperóxidos lipídicos

MeOH- álcool metílico

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH diaforase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato diaforase

NADPH oxidases- Nicotinamina adenina dinucleotídeo fosfato oxidases

NADPH ox 2 – NADPH oxidases tipo 2

NBT – azul de nitrotetrazol

NOS- Nitric oxide synthase (do inglês)

nNOS- nitric oxide synthase neuronal

O₂ – oxigênio molecular

O₂^{•-} – ânion superóxido

OH[•] – radical hidroxil

ONOO—peroxinitrito

PAP – peroxidaseanti oxidase

PBS – tampão fosfato-salina

PI3K – fosfatidil inositol-3-cinase

PIP3 – fosfatidilinositol-trifosfato

PL – distância da extremidade do 3° dedo até o calcâneo

PMSF – fenil-metil-sulfonil fluoreto

RNS – espécies reativas de nitrogênio (do inglês, reactivenitrogenspecies)

R- direito (do inglês right)

ROS – espécies reativas de oxigênio (do inglês, reactiveoxygenspecies)

RX-XO – reagente de trabalho do xilenol laranja

SAG – geração de ânion superóxido

SNC – sistema nervoso central

SOD – enzima superóxido dismutase

TAC – capacidade antioxidante total

TS – Distância do 1° ao 5° dedo

TPP - trifenílfosfina

XO – xilenol laranja (do inglês Orange xylenol)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
EPÍGRAFE.....	V
APRESENTAÇÃO.....	VI
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
SUMÁRIO.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Aspectos gerais sobre envelhecimento.....	01
1.2 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e sistemas antioxidantes: participação no Envelhecimento.....	04
1.3 Sistema Vestibular e Envelhecimento.....	08
1.4 Benefícios do exercício físico durante o Envelhecimento.....	09
2. Hipótese.....	13
3. Objetivos.....	14
3.1 Objetivo Geral.....	14
3.2 Objetivos Específicos.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
4.1 Animais: Procedimento e Manutenção.....	16
4.2 Protocolo de Exercício Físico.....	18
4.3 Testes Funcionais.....	19
4.3.1 Testes de Marcação de Patas.....	20
4.3.2 Teste de Barra estreita.....	23
4.4 Preparo das Amostras.....	24
4.5 Parâmetros de Estresse Oxidativo.....	25
4.5.1 Formação de anion Superóxido.....	25
4.5.2 Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	26
4.5.3 Hidroperóxidos Lipídicos.....	26
4.5.4 Capacidade Antioxidante Total.....	27
4.5.5 Conteúdo de Tióis Totais.....	27
4.5.6 Superóxido Dismutase (SOD).....	27
4.6 Quantificação de Proteínas.....	28
4.7 Estimativa da Perda de Massa Muscular Esquelética.....	28
4.8 Parâmetros Plasmáticos.....	28
4.9 Raio X do Fêmur.....	29
4.10 Análise Estatística.....	30
4.11 Disposição Final dos Resíduos da Pesquisa.....	31
4.11.1 Resíduos Químicos.....	31
4.11.2 Resíduos Biológicos.....	31
5. Resultados.....	32
5.1 Artigo 1.....	33
5.2 Artigo 2.....	47

6. Discussão.....	83
7. Conclusões.....	97
8. Perspectiva.....	99
9. Referências.....	100
10. Anexos	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 Envelhecimento

A população mundial está se tornando envelhecida dada às mudanças que estão ocorrendo em todo o mundo, como diminuição nas taxas de fertilidade e aumento na expectativa de vida (VALERA et al., 2019; SHWE, 2018; KRATZ et al, 2018; KALACHE, 2008). Uma classificação para o ciclo vital da vida de humanos é a que segue: adulto, jovem com idades entre 20 a 40 anos; meia-idade, idades entre 40 a 65 anos; terceira idade, dos 65 anos em diante. Segundo KARA-JOSÉ et al. (2008), a Organização Mundial da Saúde classifica o envelhecimento em quatro estágios: meia-idade, 45 a 59 anos; idoso, 60 a 74 anos; ancião, 75 a 90 anos; e velhice extrema, 90 anos em diante.

As estimativas de crescimento da população mundial projetam o número de pessoas com idade acima de 60 anos em cerca de dois bilhões por volta de 2050 (QI et al., 2019; NEUMANN; ALBERT, 2018; VÁZQUEZ et al.,2018). Segundo NEUMANN; ALBERT (2018), os indivíduos com mais de 60 anos de idade representará 22% da população mundial, e 80% desta população estará vivendo em países em desenvolvimento. No Brasil, um país em desenvolvimento, se estima 64 milhões o número de pessoas com idade acima de 60 anos por volta de 2050 (NEUMANN; ALBERT, 2018; MIRANDA et al., 2016). Segundo dados mais recentes divulgados pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a proporção de brasileiros com idade acima de 65 anos passará de 9,5% para 25,5% até o ano de 2060. O IBGE estima ainda que no estado do Rio Grande do Sul a proporção de indivíduos com idade acima de 65 anos passará de 12,7% para 29% até 2060.

Em países desenvolvidos, o envelhecimento ocorre de forma gradual, acompanhando o crescimento econômico e social do país. Porém, em países em desenvolvimento, o envelhecimento da população está se dando antes mesmo da implantação de políticas sociais efetivas para redução de disparidades sociais, embora iniciativas já estejam em andamento nesses locais (NEUMANN; ALBERT, 2018). No Brasil, um grande avanço foi a criação do Estatuto do Idoso (LEI N° 10.741, DE 1° DE OUTUBRO DE 2003), destinado a regular os

direitos assegurados às pessoas com idade igual ou superior a 60 anos. Dentre as conquistas mais recentes está o plano “Estratégia Brasil Amigo da Pessoa Idosa”, criado em 03 (três) de abril de 2018. Esse plano propõe uma busca para alcançar o envelhecimento ativo, saudável, cidadão e sustentável para todos os brasileiros (site Nações Unidas – Brasil).

Considerando as taxas de projeções elevadas para a população velha e idosa, torna-se importante conhecer os mecanismos envolvidos no processo de envelhecimento, pois isso fornecerá subsídios para implantação de políticas mais efetivas para envelhecimento saudável.

As pesquisas mostraram até o presente momento que envelhecimento é um processo dinâmico e progressivo, no qual ocorrem modificações morfológicas, funcionais e psicológicas que determinam a progressiva perda da capacidade de adaptação do indivíduo ao meio ambiente, ocasionando maior vulnerabilidade e incidência de processos patológicos (KRUK et al., 2019; ENGERS et al., 2010; MARCHI NETO, 2004; HARMAN, 1981). Segundo alguns autores (LIMA et al., 2011; ESQUENAZI et al., 2014), o envelhecimento é um processo no qual as alterações iniciam precocemente e vão evoluindo de forma lenta e gradual, não ocorrendo necessariamente em paralelo com o avanço da idade cronológica, e apresenta variação individual. ESQUENAZI et al. (2014) relatou que o envelhecimento inicia na concepção e constitui um processo natural de diminuição progressiva da funcionalidade dos indivíduos. O processo é acompanhado por modificações em diferentes sistemas do organismo, como antropométrico, cardiovascular, pulmonar, nervoso e outros (SCHWARZ et al., 2009; MORA et al., 2007; MATSUDO et al., 2000). Em músculos esqueléticos ocorre perda de sua massa, processo chamado sarcopenia, caracterizado por queda no número e tamanho de fibras musculares (MORLEY et al., 2011; HIDA et al., 2014; PANNÉREC et al., 2016). O avanço da idade também provocou declínio no sistema musculoesquelético, o qual compreende ossos, tendões, ligamentos, cartilagens e músculos associados (KRUK et al., 2019; DOMAZETOVIC et al., 2017; ALMEIDA; O'BRIEN, 2013). Assim, o envelhecimento traz consequências ao comportamento do indivíduo, como, por exemplo, alterações na motricidade.

As alterações no controle motor podem levar a queda, uma ocorrência comum em humanos velhos e/ou idosos. A origem da queda pode ser associada não apenas a fatores intrínsecos, decorrentes de alterações fisiológicas do envelhecimento, doenças e efeitos de medicamentos, mas também a fatores extrínsecos, circunstâncias sociais e ambientais que

oferecem desafios ao idoso (RIBEIRO et al., 2008). As consequências da queda em pessoas dessas faixas etárias é um dos principais problemas na medicina geriátrica e na saúde pública (VERGHESE; AYERS, 2017; FALSARELLA et al., 2014; AAMA, 2011). Pesquisas mostram que mais de um terço das pessoas com idade de 65 anos ou mais passam por algum tipo de queda a cada ano e, na metade dos casos, as quedas são recorrentes (GERARDS et al., 2017). O risco de algum tipo de queda duplica ou triplica quando há presença de comprometimento cognitivo ou histórico de quedas anteriores no paciente. Ainda, as quedas geralmente estão associadas à restrição na mobilidade, fraturas, depressão, incapacidade funcional, perda da independência e autonomia, institucionalização e declínio na qualidade de vida (BROSEL et al., 2016; GRANACHER et al., 2012; AAMA, 2011; PADOIM et al., 2010; WHO, 2007; CHAMOWICZ, 1987).

A recuperação após uma queda de pessoas velhas ou idosas é lenta e onerosa, tanto ao indivíduo como ao poder público (GELL; PATEL, 2019; ESQUENAZI et al., 2014; NARSI, 2008; GAZZOLA et al., 2005; TANG et al., 2002; ALVAREZ et al., 2000). Apesar de terem sido identificados múltiplos fatores de risco para quedas (FHON et al., 2016; UNGAR et al., 2013), ainda não se sabe ao certo os mecanismos celulares e moleculares que levam a essa condição. A identificação de mudanças biológicas específicas associadas à queda em humanos velhos e idosos pode abrir novos caminhos para o desenvolvimento de intervenções que venham a reduzir o risco dessa ocorrência nesses indivíduos. Neste contexto, torna-se também imperativo o conhecimento dos processos envolvidos no envelhecimento para se desenvolver hábitos e políticas que levem a envelhecimento saudável.

Os estudos sugerem que o envelhecimento é um processo complexo, progressivo, heterogêneo, deletério e irreversível, que se caracteriza por afetar todos os organismos vivos e conduzir a uma redução adaptativa, aumentando a vulnerabilidade, determinando declínio funcional, aumentando o número de doenças e o risco de morte (KRUK et al., 2019; ENGERS et al., 2010). Diversas teorias tentam explicar o processo de envelhecimento. Porém, uma teoria que tem se destacado nas últimas duas décadas é a que propõe alterações em espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*). Segundo essa teoria, o envelhecimento levaria a um aumento na formação de ROS e, como consequência, desregulação em sistemas de sinalização intracelulares onde essas espécies participam direta ou indiretamente (RAJAGOPEL et al., 2016; VINÃ et al., 2013; POLJSK et al., 2013;

WICKENS, 2011; RADAK, 2008; ROSA et al., 2005; HARMAN, 1992). As ROS são apresentadas no item a seguir deste texto.

1.2 Espécies reativas de oxigênio (ROS) e sistemas antioxidantes: participação no envelhecimento

As ROS são geradas como intermediários no metabolismo energético normal das células (HALLIWELL; GUTTENRIDGE, 2015; PISOSCHI; POP, 2015). Existem inúmeras fontes endógenas de ROS, como a enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidases (NADPH oxidases) e a respiração mitocondrial (GRACE et al., 2016; PISOSCHI; POP, 2015; KIM, et al., 2004; CADENAS; DAVIES, 2000). As ROS podem ser radicalares, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}), ou não radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O $O_2^{\bullet-}$ pode potencialmente reagir com componentes celulares próximos, mas é rapidamente convertido a H_2O_2 , uma molécula mais estável que o $O_2^{\bullet-}$. Ainda, o H_2O_2 pode reagir com metais de transição, como ferro e cobre, presentes na célula, dando origem ao radical OH^{\bullet} (KRUK et al, 2019; SCHIEBER; CHANDEL, 2014; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Este último é extremamente reativo, propagando a formação de ROS como uma reação em cadeia, mediante remoção de elétrons de outras moléculas e transformação destas em novos radicais. O H_2O_2 , por sua vez, tem menor reatividade, mas pode se difundir pelo citoplasma e eventualmente chegar ao núcleo e reagir com o DNA (KRUK et al, 2019; BECKHAUSER; FRANCIS-OLIVEIRA; PASQUALE, 2016; KIM et al., 2015; LIOCHEV, 2013).

Devido a sua natureza altamente reativa, as ROS, quando em excesso, podem levar a situações de estresse celular mediado por oxidantes (PISOSCHI; POP, 2015; KALLENBORN-GERHARDT et al., 2013; POLJSKAK et al., 2013; SIES, 1991). Por outro lado, em baixas concentrações, essas espécies atuam benéficamente em diversas funções fisiológicas, como respostas mitogênicas, ativação de fatores de transcrição e regulação de vias de sinalização intracelular (PIZZINO et al., 2017; ADAMS et al., 2015; CIRCU; AW, 2010; DROGE, 2002). De acordo com Poljsak et al. (2013), um ambiente levemente pró-oxidativo é necessário para

manter os processos de sinalização em condições ideais, o que sugere que as correções nas concentrações de ROS devem ser sutis.

A homeostase redox das células é cuidadosamente mantida por um elaborado sistema de defesas antioxidantes, constituído por componentes enzimáticos e não enzimáticos (POLJSAK et al., 2013). Os antioxidantes são moléculas que quando presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável previnem a oxidação do substrato (HALLIWELL; GUTTENDGE, 2015; SALMON et al., 2010). Os antioxidantes possuem papel essencial na regulação da produção de ROS e na proteção do meio intracelular aos danos causados pelo excesso de ROS (PIZZINO et al., 2017; DROGE, 2002). Dentre as primeiras linhas de defesas antioxidantes enzimáticas, destaca-se a superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão de $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 . O H_2O_2 , por sua vez, pode ser eliminado pela catalase ou peroxidases (FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Entre os antioxidantes não enzimáticos, destaca-se o ácido ascórbico, a glutathione e o alfa-tocoferol. A glutathione é um tripeptídeo capaz de reduzir e regenerar várias moléculas oxidadas, atuando também como um eficiente *scavenger* de ROS (HALLIWELL; GUTTENRIDGE, 2015; SALMON et al., 2010). Os tióis totais, dentre os quais está a glutathione, são particularmente sensíveis às reações redox e são considerados sensores redox, os quais interagem com diferentes tipos de oxidantes para formar, em diversas situações, uma modificação covalente reversível que inclui a formação de pontes dissulfídicas, principal mecanismo por meio do qual se pode controlar a função de proteínas (EATON, 2006; DROGE, 2002). Assim, um marcador importante de oxidação de proteínas é o conteúdo de tióis totais (TROMM et al., 2012).

O sistema nervoso central (SNC), composto pela medula espinal e encéfalo, é alvo do processo de envelhecimento como qualquer outro sistema corporal (JOVÉ et al., 2019). Segundo STEFANATOS e SANZ (2018), o encéfalo é o órgão mais complexo, o qual consome mais energia do que qualquer outro tecido em proporção ao seu tamanho. De acordo com esses autores, o envelhecimento provoca acúmulo de mitocôndrias danificadas, as quais passam a produzir menos ATP (trifosfato de adenosina) e mais ROS. O aumento nessas espécies provoca estresse oxidativo, mais danos em mitocôndrias e, conseqüentemente, uma crise energética que dispara doenças neurodegenerativas e acelera o envelhecimento.

No SNC, o envelhecimento provocou alterações em diversas regiões, incluindo áreas com papel importante no controle motor, postural e equilíbrio (GARG et al., 2018; DEVI 2009;

STEFANATOS; SANZ, 2018; ZHANG et al., 2013; YEOMAN et al., 2012). Apesar de o SNC ser uma estrutura contínua, foi demonstrado que mitocôndrias da medula espinal possuem bioenergética que difere daquela do encéfalo (YONUTAS et al., 2015). Segundo esses autores, a respiração mitocondrial mediada por NADH e FADH₂ diminuiu em córtex cerebral e nos segmentos cervical, torácico e lombar da medula espinal ao longo do envelhecimento. Ainda, a mitocôndria da medula espinal produziu mais ROS do que a mitocôndria do encéfalo, independente da idade do animal do qual foram isoladas as mitocôndrias (YONUTAS et al., 2015). Nesse estudo foi também relatado que a formação de ROS aumentou cerca de 200 a 600% no SNC de ratos velhos da linhagem Sprague-Dawley comparado a valores obtidos em animais jovens, e o aumento se deu principalmente em córtex cerebral e segmentos cervical, torácico e lombar da medula espinal. Porém, a quantificação de ROS foi feita por método fluorescente usando diclorofluoresceína, o qual não permite discriminar qual ROS está aumentada (WINTERBOURN, 2015). Portanto, uma questão ainda em aberto é relacionar o efeito do envelhecimento sobre ROS específica. Esse conhecimento, com certeza, contribuirá para um melhor entendimento das alterações específicas que ocorrem nas ROS durante o envelhecimento.

No encéfalo, o envelhecimento também aumenta a formação de ROS, mas as alterações parecem depender da região (STEFANATOS; SANZ, 2018; JACKSON; MCAEDLE, 2016; LIOCHEV, 2013; YEOMAN et al., 2012; BOKOV et al., 2004). Foi demonstrado que mitocôndrias isoladas de córtex cerebral e hipocampo de ratos velhos produziram mais ROS comparada àquelas isoladas de animais jovens, mas essa alteração não ocorreu em cerebelo (YONUTAS et al., 2015). O envelhecimento também provocou acréscimo na peroxidação de lipídeos e em hidroperóxidos lipídicos em telencéfalo, cerebelo e tronco encefálico de ratos com idades de 6, 13, 19 e 26 meses comparado a ratos com 3 meses (GUPTA et al., 1991). Segundo STEFANATOS & SANZ (2017), as diferenças na função mitocondrial, específicas para cada região encefálica, podem ser a razão de certas áreas do encéfalo serem desproporcionalmente mais afetadas pelas ROS durante o envelhecimento; e essas diferenças podem desempenhar um papel fundamental em doenças neurodegenerativas relacionadas à idade.

O avanço da idade também provocou modificações em antioxidantes no SNC. Em medula espinal, o conteúdo de tióis totais estava significativamente reduzido em ratos com idades de 24-26 meses comparado a animais de idades 3-4 meses (BALU et al., 2005). Todavia, permanecem ainda desconhecidas as variações graduais em tióis totais ocasionadas pelo envelhecimento, tanto

em medula espinal como em encéfalo. Em córtex cerebral de ratos de 24 meses, a relação entre glutatona reduzida e oxidada diminuiu comparada àquela dessa região encefálica de ratos de 3 meses (SOUZA et al., 2018). Nesse estudo foi observado ainda aumento na atividade da SOD no córtex cerebral de ratos velhos. Entretanto, outro estudo relatou queda na atividade da SOD em telencéfalo, cerebelo e tronco encefálico de ratos com idades de 6, 13, 19 e 26 meses, comparado a 3 meses (GUPTA et al., 1991). Em camundongo, o conteúdo de glutatona aumentou em cerebelo e tronco encefálico com o avanço da idade (HUSSAIN et al., 1995). Porém, ainda se desconhece as alterações em antioxidantes em regiões encefálicas de ratos na senescência, idade de 30 meses para ratos da linhagem Wistar (ALTUN et al., 2007; JOLITHA et al., 2006). Foi demonstrado que poucas das alterações neuroquímicas encontradas no tecido nervoso aos 30 meses estavam presentes em idades intermediárias (VIRGILI et al., 2001).

Considerando o conhecimento até aqui apresentado, as respostas às questões anteriores poderão proporcionar uma visão mais ampla das variações decorrentes do envelhecimento e, assim, oferecer subsídios ao melhor entendimento de terapias antioxidantes para envelhecimento saudável. Ademais, o envelhecimento leva a mudanças em neurônios motores, as quais comprometem a locomoção e torna os indivíduos susceptíveis a quedas (PANNESE, 2011; JAHN et al, 2010; SHANKAR, 2010; SCHWARZ et al, 2009; LEXEL, 1997). Foi proposto que alterações morfofuncionais em regiões centrais no processamento de informações importantes no controle da postura e equilíbrio estariam associadas a menor capacidade de resposta do idoso frente a perturbações posturais, e isso contribuiria para a queda do indivíduo (KLEINER et al, 2011; JAHN et al, 2010; CARTER; RAY, 2008; BERNHARDI, 2005; RUWER et al, 2005; GAZZOLA et al, 2005). Por questões de interesse nesse trabalho, a seguir são apresentados dados referentes a alterações morfofuncionais no sistema vestibular. Esse sistema é o responsável por fornecer ao encéfalo uma estimativa rápida dos movimentos da cabeça, informação com papel importante no controle da postura e equilíbrio (ALLEN, 2016; VIGNAUX et al., 2015; CULLEN, 2012; KLEINER et al., 2011; CARTER; RAY, 2008; RUWER et al., 2005).

1.3 O Sistema vestibular e o Envelhecimento

O sistema vestibular está constituído pelo aparelho vestibular, núcleos vestibulares centrais e suas áreas de projeções (BROSEL; STUPP, 2019; BROSEL et al., 2016; TASCIOGLU, 2005). O aparelho vestibular, localizado dentro da orelha interna, é um detector dos movimentos e da posição da cabeça, e sua informação, transmitida para os núcleos vestibulares centrais por meio da porção vestibular do oitavo nervo craniano, desempenha papel importante no controle reflexo da postura e equilíbrio. Existem dois conjuntos distintos que formam o aparelho vestibular: os três canais semicirculares, cujas informações se destinam principalmente aos núcleos vestibulares superiores e mediais, e estão relacionadas principalmente com a resposta reflexa que controla o olhar; e os órgãos otolíticos (utrículo e sáculo), cujos axônios aferentes se destinam principalmente ao núcleo vestibular descendente, o qual está envolvido na integração da sinalização vestibular com a informação motora central. Algumas fibras aferentes dos órgãos otolíticos também se destinam ao núcleo vestibular lateral, relacionado com reflexos posturais, e núcleo vestibular medial (BROSEL et al., 2016; CULLEN, 2012). Projeções dos núcleos vestibulares se destinam a vários alvos centrais, como núcleos oculomotores, centros reticulares e espinais relacionados com o movimento de músculos esqueléticos, cerebelo e núcleos talâmicos, esses últimos projetam para áreas corticais (HITIER et al., 2014; BARMACK, 2003). Devido às suas conexões centrais, as informações vestibulares participam nos mecanismos que rapidamente promovem alinhamento da massa corporal necessário para o controle postural adequado frente a qualquer perturbação. Assim, um bom funcionamento no sistema vestibular é fundamental para o controle postural do indivíduo jovem e adulto (ESQUENAZI, et al. 2014; RUWER et al., 2005).

Segundo JI & ZHAI (2019), as mudanças no sistema vestibular decorrentes do envelhecimento poderiam desempenhar papel importante nos problemas posturais de indivíduos velhos e idosos. De fato, os estudos mostraram que o avanço da idade provocou mudanças significativas no sistema vestibular, muitas das quais são listadas a seguir: redução no número de neurônios em diversos núcleos que compõem esse sistema (ANSON; JEKA, 2016; ALLEN et al., 2016; TANG et al., 2002; LOPEZ, 1997; SLONE et al., 1989; BEGSTRON, 1973); diminuição no número de células receptoras sensoriais vestibulares na orelha interna (HIM et al., 2010; FERNANDEZ et al., 2007; RAUCH et al., 2001; NADOL; SCHUKNECHT, 1990; ANNIKO, 1983; BABIN; HARKER, 1982); redução no número de neurônios no gânglio de

Scarpa ou vestibular (EISIN, 2007; RAUCH et al., 2001); perda da densidade de mielina em fibras aferentes que levam a informação do aparelho vestibular ao SNC (BERGSTON,1973); redução na velocidade de condução do estímulo elétrico na porção vestibular do oitavo nervo craniano (FERNÁNDEZ et al., 2007; RAUCH et al., 2001; ALVAREZ et al., 2000; ROSEHAL, 1973); e variações em neuroquímicos com diferentes funções nos núcleos vestibulares (para revisão, ver SMITH, 2016). Ademais, as alterações na função vestibular parecem contribuir para a perda óssea induzida pelo envelhecimento (VIGNAUX et al., 2015).

1.4 Os benefícios do Exercício Físico durante o Envelhecimento

A atividade física é definida como qualquer movimento corporal produzido em consequência de contração muscular, o qual leva a gasto calórico. É um termo geral que se usa para referir às atividades que podem ser de natureza aeróbica ou anaeróbica, que inclui andar de bicicleta, caminhar, jardinagem, dança e natação (ERICKON et al., 2014). Segundo esses autores, o exercício físico é uma atividade estruturada que melhora a aptidão física, e intervenções com exercícios geralmente avaliam a aptidão cardiorespiratória (VO_2 máximo) para testar a eficácia da intervenção para melhorar a capacidade aeróbica. O exercício pode ser aeróbico ou anaeróbico (ARAKELIAN et al.,2019; CHODZKO-ZAJKO et al., 2009; CRUZAT et al, 2007). Por questões de interesse, nesse trabalho será abordado o exercício aeróbico.

No exercício aeróbico há participação do oxigênio na quebra de substratos que produzem energia, a qual é fornecida ao músculo em atividade. A proporção da utilização dos substratos energéticos é dependente da intensidade do exercício físico (RADAK et al., 2019; VANZELLA et al., 2017; SASAKI, 2006; MATSUDO, 2001; CASPERSEN et al., 1985).

O exercício aeróbico é um exercício de longa duração. Como exemplos desse tipo de atividade pode-se citar corrida, pedalada, entre outros (SILVA et al., 2014; KRAMER et al, 2006; SINGH, 2002). Em humanos idosos, a realização de exercícios físicos proporcionou resultados positivos já em curto prazo, o que contribuiu de forma positiva em diversas condições patológicas, como doenças crônico-degenerativas, hipercolesterolemia, doenças cardíacas (POLLOCK et al., 2000), hipertensão arterial (SINGH, 2004; 2002), e diabetes melitus (FLUCKEY et al.,1994). O exercício também provocou redução no acúmulo de tecido adiposo

(KOHRR, 1992); aumentou a concentração plasmática de fibrinogênio (RIBEIRO; OLIVEIRA, 2005); promoveu redução na ansiedade e depressão (HAYES et al., 2008; BLUMENTHAL, 1999; FOLKINS, 1981); e diminuiu o risco de ocorrência de quedas e fraturas em idosos humanos (LAURITZEN, 1993), contribuindo, assim, para a independência do idoso (CIVINSKI et al., 2011; CHODZKO-ZAJKO, 2009; ANTUNES, 2006; RUWER, 2005; SINGH, 2002; CARRO et al., 2001; EVANS, 1992).

A realização de exercício físico também determinou, em humanos e ratos, uma melhora no consumo máximo de oxigênio em idosos (CHODZKO-ZAJKO, 2009; HUANG, 2005; RIMMER, 2005); proporcionou acréscimo na formação de novos neurônios (CARRO et al., 2001; KRONENBERG et al., 2006; CARRO et al., 2001); induziu melhora na atividade de neurônios no hipocampo, uma região encefálica com papel importante na formação de memórias (LOVATEL et al., 2014; ELSNER et al., 2013; SIM et al., 2005; van PRAAG et al., 2005; KIM et al., 2004); acelerou a remoção de debris celulares e modulou sinapses no tecido nervoso (LEE et al., 2012; MORA et al., 2007; CARDOSO, 2007; KRAMER et al., 2006; KRAMER et al., 2005; KLEIN, 2003; COTMAN, 2002; CARRO et al., 2001; MATTSON, 2000; KRAMER et al., 1999; KHALSA, 1998). O exercício físico regular ainda promoveu aumento na produção de fatores neurotróficos (VANZELLA et al., 2017; HIM, 2010; SCHARFMAN et al., 2005; MATTSON, 2002; CARRO et al., 2001; COTMAN, 2002) e menor perda de tecido nos córtices frontal, parietal e temporal induzida pelo avanço da idade (COLCOMBE et al., 2006; COLCOMBE, 2003; CHURCHILL et al., 2002). Em humanos, foi sugerido que a realização de exercício promove a socialização de idosos, evento importante na neurogênese (DING et al., 2002).

O exercício físico também aparece como uma estratégia benéfica aos efeitos deletérios do aumento de ROS no encéfalo, uma vez que ele proporcionou melhora em funções cerebrais por aumentar a disponibilidade de oxigênio e glicose ao tecido, acelerar a remoção de necrosados e promover alterações em neurotransmissores (REAL et al., 2015; KRAMER et al., 2006; COLCOMBE et al., 2004; DING et al., 2002). Ademais, animais treinados aerobiamente apresentaram aumento na densidade de capilares em cerebelo, estriado e em córtices frontal, parietal e temporal (REAL et al., 2015; COLCOMBE et al., 2006; 2004). Animais submetidos a protocolos de treinos também apresentaram maior número de sinapses em cerebelo e exibiram proliferação celular, aumento na sobrevivência celular e neurogênese em hipocampo (BITTNER et al., 2019; ZOPPI et al., 2003; GRILL et al., 2002;). Ainda, os programas de exercício também

foram capazes de ativar mecanismos para remoção de ROS no encéfalo de ratos velhos (de SOUZA et al., 2018; MELO et al., 2018; HARMAN, 2003).

O exercício físico também foi capaz de prevenir a sarcopenia em idosos. As fibras musculares esqueléticas podem ser dos tipos I, IIa e IIb. As do tipo I são oxidativas com velocidade de contração lenta, enquanto as do tipo IIa são glicolíticas e as IIb são glicolíticas oxidativas, ambas com velocidade de contração rápida (KRAMER & COLCOMB, 2005). Os estudos mostraram que o envelhecimento provocou atrofia principalmente em fibras do tipo IIb (KRAMER & COLCOMB, 2005; NAVARRO et al, 2001). Porém, em idosos, o treinamento físico foi capaz de atenuar e/ou reverter a perda de massa muscular e a funcionalidade das fibras musculares devido ao seu efeito modulador em parâmetros oxidativos e inflamatórios (VILELA et al., 2018).

Todavia, o efeito do exercício físico parece depender de intensidade e/ou frequência de realização (PATERSON; JONES; RICE, 2007). Os estudos mostraram que o exercício físico regular aumentou antioxidantes endógenos e reduziu danos oxidativos em encéfalo, enquanto o exercício extenuante induziu acréscimo em ROS e queda em sistemas antioxidantes nesse tecido (de SOUZA et al., 2018; SCOPEL et al., 2006; JI, 2002). Uma meta-análise recente relatou que a frequência de realização do exercício físico também influenciou o equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes no encéfalo, embora ainda haja muita especulação sobre a quantidade terapêutica da atividade física durante o envelhecimento (de SOUZA et al., 2018).

Uma intensidade de exercício que tem se mostrado benéfica em humanos e ratos é o de baixa intensidade. A realização desse tipo de exercício por 9 semanas foi capaz de atenuar o estresse oxidativo em miocárdio, a congestão pulmonar, a dilatação do átrio direito e a disfunção em miocárdio em ratos diabéticos (GIMENES et al., 2015). O exercício de baixa intensidade também promoveu aumento na irrigação sanguínea em músculo em contração, expansão do leito capilar que irriga o músculo para garantir maior liberação e difusão do oxigênio sem qualquer alteração na capacidade oxidativa muscular (BOUSHEL et al., 2014). Recentemente se mostrou que a realização desse tipo de exercício físico melhorou a função motora de pacientes com doença de Parkinson em estágio inicial (CHANG et al., 2018). A realização de exercício de baixa intensidade também foi capaz de induzir menor formação de ROS e de nitrogênio em sangue de homens saudáveis (ROH et al., 2017). Em camundongos, o exercício de baixa intensidade em esteira protegeu a retina da degeneração induzida pela luz, o que não foi observado nos animais

submetidos a exercício de alta intensidade (MEES et al., 2019). Segundo esses autores, o exercício de baixa intensidade não provocou aumento na concentração sanguínea de corticosterona, o que indicou que o exercício não induziu estresse aos animais. Em ratos selecionados a partir de progenitores com pouca ou nenhuma resposta ao treinamento, a realização de exercício de baixa intensidade em fase tardia da vida preveniu o declínio associado à idade na capacidade funcional ao exercício (BROWN et al., 2019).

Apesar de o exercício de baixa intensidade não parecer suficiente para prevenir de forma significativa as alterações no metabolismo e fatores de risco cardiovasculares aumentados pela idade (NELSON et al., 2007; MEYER et al., 2007), a realização desse tipo de exercício levou a variações metabólicas e cardiovasculares que foram na direção de um efeito benéfico devido ao equilíbrio estável entre pró-oxidantes e antioxidantes, o qual tinha sido desestabilizado pelo avanço da idade (REAL et al, 2015; MAZZEO; TANAKA, 2001; NOHL, 1993). Ademais, foi sugerido que humanos idosos são particularmente motivados a fazerem exercício de baixa intensidade devido ao declínio funcional e estrutural nas funções corporais e a facilidade na execução dos protocolos de exercício (MAZZEO; TANAKA, 2001; MCPHILLIPS et al., 1989).

Apesar de os inúmeros benefícios, se desconhece se a realização de exercício físico de baixa intensidade é capaz de melhorar o desempenho de animais de meia idade, velhos e idosos em testes específicos de avaliação do passo e do equilíbrio. Esses dados, sem dúvida, trarão maior entendimento dos efeitos do exercício regular de baixa intensidade sobre as alterações induzidas pelo envelhecimento em função motora e equilíbrio, biomarcadores de estresse oxidativo no SNC, e perdas de massa muscular esquelética e óssea.

2. HIPÓTESE

O avanço da idade provocará: 1) alterações no equilíbrio e no passo, 2) mudanças em biomarcadores de estresse oxidativo no SNC, e 3) perdas na massa muscular esquelética e na massa óssea do fêmur em ratos Wistar.

O exercício físico de baixa intensidade em esteira, realizado 3 vezes/semana, durante 12 semanas, trará benefícios à postura e ao equilíbrio no animal velho, e provocará alterações nos biomarcadores no tecido nervoso que serão na direção contrária àquela induzida pelo envelhecimento. Ainda, esse tipo de exercício será capaz de prevenir a perda na massa muscular esquelética, e induzir mudanças no aspecto radiográfico do osso fêmur indicadoras de prevenção de perda óssea.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho pretendeu avaliar os efeitos do envelhecimento e do exercício físico regular de baixa intensidade em esteira sobre: 1) parâmetros da marcha e equilíbrio, e 2) biomarcadores oxidativos em medula espinhal, tronco encefálico, cerebelo e córtex cerebral em ratos Wistar machos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Determinar o efeito do envelhecimento e do exercício regular de baixa intensidade em esteira, realizado 3 vezes/semana, por 30 minutos, durante 12 semanas, sobre os seguintes aspectos:

3.2.1.1 Parâmetros da marcha e equilíbrio, mediante avaliação de:

a) Desempenho de ratos Wistar machos com idades de 3, 6, 18, 24 e 30 meses, sedentários, e 6, 18 e 24 meses, treinados, nos testes de marcação das patas e da barra estreita, os quais permitem avaliar coordenação motora e equilíbrio, respectivamente.

3.2.1.2 Parâmetros de estresse oxidativo, mediante análise de:

a) Capacidade antioxidante total (TAC), conteúdo de tióis totais, atividade da enzima SOD, geração de $O_2^{\bullet-}$ (SAG, do inglês *superoxide anion generation*), valores de H_2O_2 e de hidroperóxidos lipídicos no segmento lombossacral da medula espinal de ratos sedentários e treinados;

b) TAC, conteúdo de tióis totais, atividade da enzima SOD, e valores de hidroperóxidos lipídicos nas regiões encefálicas que seguem: tronco encefálico, cerebelo e córtex cerebral de ratos sedentários e treinados.

3.2.1.3 Valores de peso corporal, obtidos ao longo do envelhecimento.

3.2.1.4 Valores da concentração plasmática de glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL colesterol em ratos Wistar sedentários e treinados.

3.2.1.5 Valores da relação entre peso do músculo sóleo e peso corporal total obtido no dia da morte dos ratos sedentários e treinados, como indicador de perda de massa muscular esquelética.

3.2.1.6 Medidas radiográficas em fêmur, para determinação do comprimento e largura desse osso; espessura da sua cortical em suas regiões medial e lateral, e total (medial+lateral); largura da cavidade medular; radioluscência; radiopacidade; rasamento no colo do fêmur; ocorrência de esclerose em cortical e/ou medular; fratura; e presença de osteófito, em ratos, sedentários e treinados.

3.2.1.7 Cálculo de correlação entre indicador de perda de massa muscular esquelética e peso corporal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS: PROCEDÊNCIA E MANUTENÇÃO

Após a aprovação pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFRGS (#29386, Anexo I), foram solicitados ao Centro de Reprodução e experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) 89 ratos da linhagem *Wistar*, machos, com peso de 250-300 g e 90 dias de vida. Os ratos foram acomodados em caixas criadouros de dimensão 40x30x16 cm, forradas com maravalha, em número de três (03) animais por caixa, e as caixas permaneceram no ratário do Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Seis ratos permaneceram nesse local por uma semana e, ao final, foram mortos por decapitação. Esses ratos constituíram o grupo de idade 3 meses, sedentários. Os outros ratos foram mantidos nas mesmas condições até as idades de 6 (n= 26), 18 (n= 26), 24 (n= 26) e 30 (n= 5) meses, quando foram mortos por decapitação ou submetidos a uma perfusão cardíaca. Como durante o envelhecimento esses ratos cresceram e aumentaram seu peso corporal, fez-se a substituição das grades de suas caixas criadouros por outras mais altas. A substituição ocorreu sempre que os ratos atingiram valor de peso corporal igual a 500 g (Altun et al., 2007). A substituição da grade permitiu aos ratos maiores se erguerem voluntariamente no interior de suas caixas criadouros.

Os ratos tiveram livre acesso à água e alimentação, e permaneceram sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 07h às 19h) e temperatura ambiente de 22 ± 2 °C. A limpeza das caixas criadouros foi realizada, no máximo, a cada dois dias. O pesquisador e a equipe de pesquisa se organizaram de tal forma que os ratos foram visitados todos os dias ao longo do envelhecimento, a fim de observar qualquer irregularidade no comportamento animal.

Para proporcionar bem estar aos ratos durante o envelhecimento, semanalmente se colocou no interior de cada caixa criadouro tubos de papelão atóxico e esterilizado (Relax[®], São Paulo, Brasil), os quais permitiram a livre entrada e saída dos ratos de seu interior (Figura 1). Todos os ratos foram monitorados frequentemente, incluindo finais de semana, para avaliação de seu aspecto físico e comportamento cotidiano. Os ratos foram pesados regularmente. Quando alguma alteração foi detectada no comportamento ou aspecto físico do animal, fez-se rapidamente contato com o veterinário responsável para providências de tratamento do(s)

sintoma(s). Quando o tratamento não foi possível ou não ocasionou melhora ao animal, se procedeu à eutanásia do mesmo o mais rápido possível, a fim de evitar sofrimento ao animal. A eutanásia seguiu rigorosamente as recomendações estabelecidas pela DIRETRIZ DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA (RESOLUÇÃO NORMATIVA CONCEA nº 37/2018 - DIRETRIZ DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL). Para a eutanásia, sempre foi usado o anestésico pentobarbital, administrado intraperitonealmente, na dose de 40 mg/kg de peso corporal (GÓRSKA, 2000).

Devido à perda de ratos por causas naturais (lesões cutâneas, tumores, verrugas, etc.), o número final de animais em cada grupo experimental foi o que segue: 26, para ratos com idade de 6 meses; 23; para ratos com idade de 18 meses; 19, para ratos com idade de 24 meses; e 3 para ratos com idade de 30 meses. Desses números, alguns ratos foram mortos por decapitação e outros submetidos à perfusão intracardíaca. O número de ratos mortos por decapitação foi o que segue: 12, para ratos com idade de 6 meses; 10, para ratos com idades de 18 e 24 meses; e 3 para ratos com idade de 30 meses. O número de ratos mortos por perfusão foi 14, para ratos com idade de 6 meses; 13, para ratos com idades de 18; e 9 para ratos com idades de 24 meses.

Em nosso estudo, os ratos receberam as classificações que segue: jovem, rato de 3 meses de idade; adulto, rato de 6 meses de idade; meia idade, rato de 18 meses de idade; velho, rato de 24 meses de idade; e idoso, rato de 30 meses de idade (ANDREOLLO et al. , 2012; SIM et al., 2005). A escolha das idades 6, 18, 24 e 30 meses se deu por estas corresponderem às idades 18, 45, 60 e 75 anos de humanos, respectivamente (ANDREOLLO et al., 2012).



Figura 1. Fotografia de rato Wistar com suas patas dianteiras sobre o tubo de papelão atóxico (Relax[®]). Note uma das aberturas do tubo, a qual permite visualizar o interior oco

Cabe destacar que o transporte dos ratos para o Laboratório de Neurobiologia Comparada (Sala 370, prédio do ICBS, UFRGS) ocorreu nos dias de seus testes comportamentais, pesagem e morte. A realização do exercício físico se deu na sala de treino (sala 130, prédio do ICBS, UFRGS) situada no Departamento de Ciências Morfológicas, e o transporte dos ratos para esse local sempre foi feito nas segundas, quartas e sextas-feiras, turno da manhã.

4.2 PROGRAMA DE EXERCÍCIO FÍSICO

Para caracterizar o efeito do exercício regular de baixa intensidade sobre os marcadores oxidativos e os indicadores de perda de massa muscular esquelética e óssea, ratos que deveriam chegar às idades de 6, 18 e 24 meses foram selecionados aleatoriamente para execução do programa de exercício. A seleção se deu quando os ratos estavam nas idades de 3 meses, para ratos que chegariam a 6 meses de idade; 15 meses, para ratos que chegariam a 18 meses de idade; e 21 meses para ratos que chegariam a 24 meses de idade. Como ratos que chegariam a 30 meses de idade estavam em número de 3 (três) aos 27 meses, esse número pequeno limitou a seleção desses ratos para o programa de exercício. Os ratos que não realizaram o programa de exercício foram considerados ratos sedentários.

Antes de iniciar o programa de exercício, os ratos foram colocados na esteira a ser usada no programa, para habituação. Esse procedimento foi realizado 3 vezes/semana, por 30 minutos, durante uma semana, sempre no horário da manhã, período a ser usado no programa de exercício. Ao final do período de adaptação, os ratos realizaram o protocolo de exercício. Como todos os animais realizaram satisfatoriamente o programa na primeira tentativa, todos foram selecionados para iniciar o programa de exercício.

O protocolo de exercício consistiu em caminhada em esteira desenhada para uso humano (Runner, Brasil), mas adaptada para ratos (Figura 2). O exercício foi realizado 3 vezes/semana, durante 30 minutos, por 12 (doze) semanas, conforme SIM et al. (2005), com modificações (PIETELLI et al., 2012). Cada sessão de exercício consistia em aquecimento por 5 minutos a velocidade de 2 m/min, e exercício por 5 minutos a velocidade de 5 m/min e 20 minutos a velocidade de 8 m/min. A inclinação da esteira sempre foi mantida em 0% e o exercício realizado

no período da manhã (das 7h às 11h), tendo os animais sido acompanhados pelo mesmo pesquisador durante as 12 semanas.

O exercício foi realizado 3 vezes/semana para evitar estresse crônico, inflamação ou dano muscular, e permitir ao fígado e músculo a recuperação do glicogênio; nenhum rato recebeu estimulação (aversiva ou apetitiva) para motivação da caminhada (PIETRELLI et al., 2012). A duração de 12 semanas foi escolhida por ter o exercício de longa duração em esteira efeito benéfico sobre a neurodegeneração induzida por estresse oxidativo em medula espinal de ratos velhos da linhagem Lewis (MELO et al., 2019). A esteira sempre foi higienizada entre as sessões de exercício.



Figura 2: Fotografia da esteira ergométrica adaptada para uso em ratos. Note a presença de ratos Wistar adultos nos compartimentos individuais da esteira.

4.3 TESTES FUNCIONAIS

Para avaliar déficits sensório-motores durante o envelhecimento, e o efeito do exercício físico regular de baixa intensidade sobre essas alterações, foram usados dois testes comportamentais: o teste da marcação das patas e o teste da barra estreita, os quais permitem avaliar coordenação motora e equilíbrio, respectivamente. O teste de marcação das patas foi

usado para determinar os comprimentos da passada e do passo e a largura do passo, e o índice funcional do nervo isquiático (IFI). O teste da barra estreita permitiu avaliar a capacidade do rato manter seu equilíbrio durante a travessia da barra estreita para alcançar uma plataforma segura.

Os ratos de todas as idades, sedentários e treinados, foram submetidos aos testes comportamentais no dia prévio ao início do protocolo de exercício e na décima segunda semana após o início do exercício, previamente à morte dos ratos (Figura 3). Os testes comportamentais foram feitos sempre no mesmo horário (7h) e pelos mesmos pesquisadores. A sequência de realização dos testes foi barra estreita seguido da marcação das patas. Dois pesquisadores sempre permaneceram na sala durante a realização dos testes, e os protocolos foram rigidamente seguidos ao longo dos experimentos.

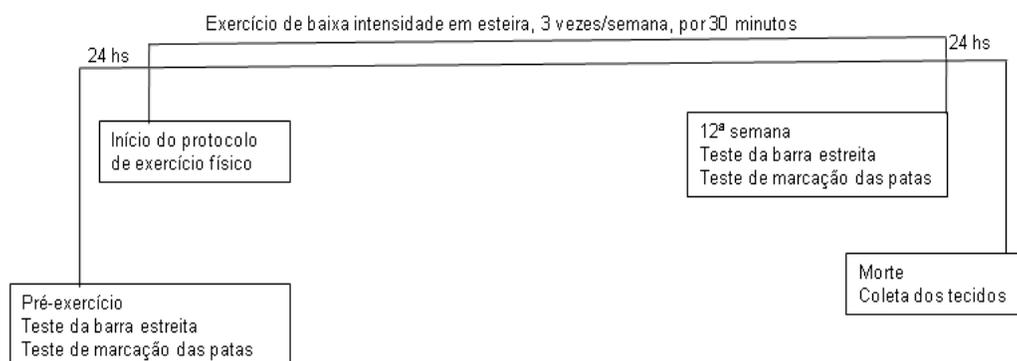


Figura 3: Esquema temporal mostrando os dias dos testes comportamentais (teste da barra estreita e teste de marcação das patas); realização do protocolo de exercício físico de baixa intensidade em esteira, com início 24 h após os testes comportamentais; e morte dos animais para coleta de tecidos 24 h após o término do período de exercício.

4.3.1 TESTE DE MARCAÇÃO DAS PATAS

A determinação dos comprimentos da passada e do passo, e da largura do passo, se fez conforme descrito por BLOOM et al. (2002). O IFI foi determinado conforme descrito por de MEDINACELI et al. (1982).

Para o teste, os ratos foram habituados ao aparato um dia antes do início dos testes experimentais, para adaptação e exploração do local. O aparato usado no teste da marcação das patas consistia em um campo aberto iluminado por uma luz (60 W). Esse campo era uma pista de

caminhada (8,5 cm de largura, 100 cm de comprimento, e bordas com altura de 18,5 cm) que finalizava na entrada de uma caixa escura de madeira (18x16x18 cm). O assoalho do corredor foi forrado com uma tira de papel branco da mesma medida da pista (Figura 4). No teste, o rato tinha a superfície plantar de suas patas dianteiras coloridas em vermelho devido ao pressionamento das patas em uma almofada de carimbo com tinta vermelha. Esse mesmo rato tinha a superfície plantar das patas traseiras coloridas em preto, também por pressionar as patas em uma almofada de carimbo com tinta preta. O rato com a superfície plantar das patas pintadas foi solto na pista de caminhada e, uma vez, livre, se deslocava para a caixa escura localizada na outra extremidade. Durante seu trajeto, as impressões das pegadas ficavam registradas no papel branco que cobria o assoalho da pista de caminhada. Ao chegar à caixa escura, o rato foi retirado do aparato, a tira de papel branco com as pegadas impressas retirada, e o aparato higienizado e preparado para uso com o próximo rato.



Figura 4: Fotografia do aparato usado no teste de marcação das patas. Note o rato no campo iluminado, cujo assoalho se encontra coberto por tira de papel branco com as mesmas dimensões da pista de caminhada. No final da pista se observa a entrada para a caixa escura.

Em cada teste, o rato deixava impressas várias pegadas. Porém, foram selecionadas para análise as pegadas com qualidade e clareza de impressão, sendo aferidas as medidas das patas direita e esquerda.

O comprimento da passada (do inglês *stride length*) foi calculado como a distância entre o final do centro da pata traseira e o centro do calcâneo da próxima marcação da mesma pata na

pista. O comprimento do passo (do inglês *step length*) foi calculado como a distância entre um apoio de pata traseira e o da pata traseira oposta. Nenhuma distinção foi feita entre as medidas esquerda e direita para comprimento do passo e da passada. Para cálculo da largura do passo (do inglês *stride width*) considerou-se a distância do centro de apoio da pata traseira esquerda ao centro da pata traseira direita (Figura 5). Todos os valores foram expressos em cm.

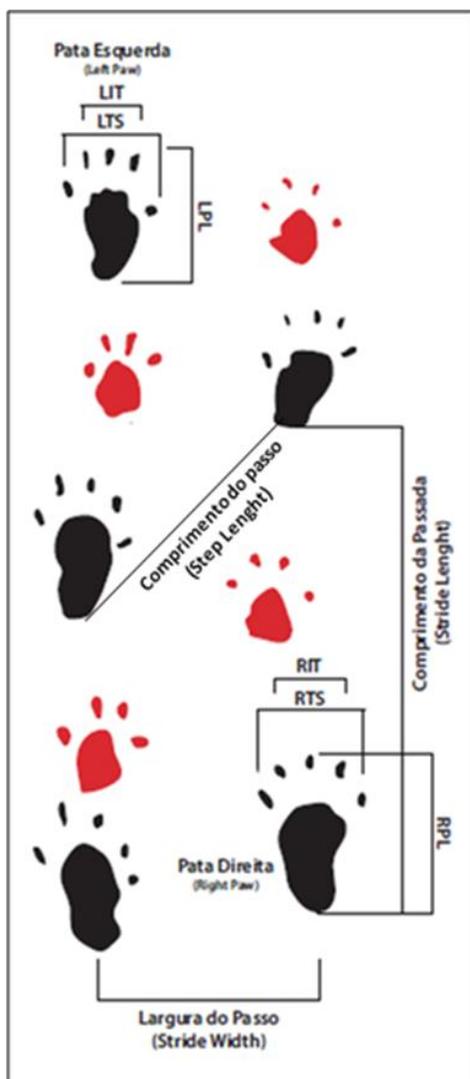


Figura 5: Esquemas de pegadas de ratos obtidas no teste de marcação das patas. Os esquemas na cor vermelha representam patas dianteiras, enquanto aqueles na cor preta são patas traseiras. As retas indicam as medidas que foram obtidas para determinação do comprimento do passo (do inglês *step length*), do comprimento da passada (do inglês *stride length*) e da largura do passo (do inglês *stride width*). Note as medidas que foram obtidas para cálculo do índice funcional do nervo isquiático: IT, distância do 2º ao 4º dedo; TS, distância do 1º ao 5º dedo; PL, distância da extremidade do 3º dedo até o calcâneo. L, pata (do inglês *paw*) esquerda (do inglês *left*); R, pata direita (do inglês *right*).

As impressões das pegadas dos ratos foram usadas também para determinar o IFI. Foram realizadas as seguintes medidas: da extensão da pegada (PL: distância da extremidade do 3º dedo

até o calcâneo), da largura da pegada (TS: distância do 1º ao 5º dedo), e da distância entre os dedos intermediários (IT: do 2º ao 4º dedo) das patas traseiras. Os valores obtidos foram usados para determinar o IFI, conforme fórmula a seguir, onde são consideradas as medidas realizadas nas patas direita e esquerda no cálculo:

$IFI = -38.3(LPL - RPL)/RPL + 109.5(LTS - RTS)/RTS + 13.3(LITS - RITS)/RITS - 8.8$, onde L se refere as medidas na pata esquerda e R as medidas feitas na pata direita do animal.

Os valores obtidos por esta fórmula foram considerados como um índice da condição funcional do nervo isquiático, expresso em déficit funcional. Variações de 0 a ± 11 estão nos desvios de normalidade da pegada. O zero representou função normal e o -100 a perda total da função. Os valores intermediários corresponderam a déficits parciais de função.

Na análise da pegada foi calculado o valor médio de cada variável para cada rato individualmente e, então, o valor encontrado foi usado para calcular a média do grupo. Todas as medidas funcionais foram realizadas manualmente por dois pesquisadores, um dos quais era cego aos grupos experimentais.

4.3.2 TESTE DA BARRA ESTREITA (do inglês *Narrow Beam Test*)

O teste da barra estreita foi usado como descrito por PRASAD; MURALIDHARA (2014), com algumas modificações (TUNG et al., 2014). Assim como no teste da marcação das patas, os ratos foram habituados ao aparato um dia antes do início dos testes experimentais. Para o teste foi usada uma viga estreita (3 cm) de 150 cm de comprimento, a qual estava situada horizontalmente a 60 cm do chão. Em uma das extremidades da viga se encontrava uma caixa escura de madeira (23×23×20 cm). A outra extremidade possuía uma plataforma rígida (Figura 6a). Próximo a essa plataforma se encontravam duas câmeras (Figura 6b) voltadas para o aparato da barra estreita, para filmagem do rato durante o teste. A viga de madeira estava marcada a cada 50 cm, e as câmeras posicionadas de modo a visualizar a marcação. O teste consistiu em colocar o rato na plataforma rígida e esse se deslocava para a caixa escura. Todo o trajeto foi filmado para posterior avaliação do tempo gasto no percurso (em segundos) e do número de deslizos das patas traseiras para a lateral da barra estreita, conforme escore a seguir: zero: rato que atravessou a barra sem deslize de pata; 1: rato que deslizou uma pata no terceiro segmento; 2: rato que deslizou uma pata no segundo segmento; 3: rato que deslizou uma pata no primeiro segmento; 4:

rato que teve deslizos de pata no primeiro e no segundo segmentos; 5: rato que teve deslizos de pata no primeiro e terceiro segmentos; 6: rato que teve deslizos de pata no segundo e terceiro segmentos; 7: rato que teve deslizos de pata no primeiro, segundo e terceiro segmentos; 8: rato que não conseguiu completar sozinho o teste.

Os resultados do teste da barra estreita foram analisados por três pesquisadores, dois eram cegos aos grupos experimentais. A média das três avaliações foi considerada o valor da variável para o rato, e usada para o cálculo da média do grupo.

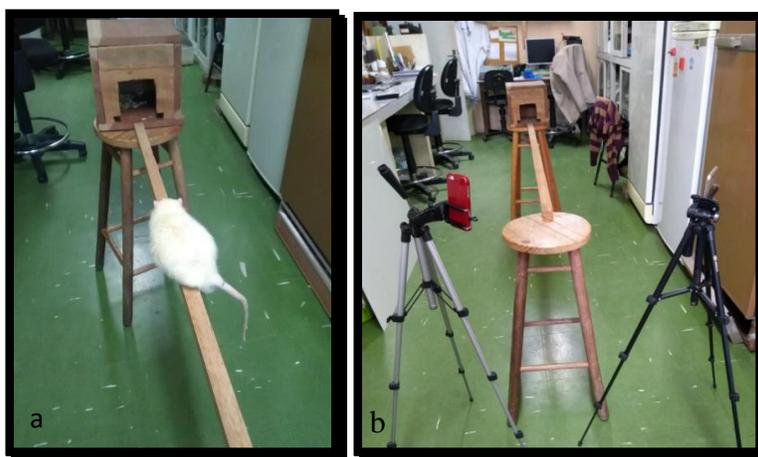


Figura 6: Fotografia mostrando o aparato usado no teste da barra estreita (a) e a posição das duas câmeras voltadas para o aparato (b), de modo a permitir filmagem das vistas esquerda e direita da barra estreita. Note o rato atravessando a barra estreita a fim de entrar na caixa escura situada na extremidade da barra (a).

4.4 PREPARO DAS AMOSTRAS

Os ratos cujos tecidos seriam usados nas análises bioquímicas foram mortos por decapitação, a qual teve início às 8h. Os ratos não foram deixados em jejum antes da morte. Imediatamente após a decapitação foi coletado sangue (2 mL) em tubos eppendorfs individuais contendo anticoagulante heparina, e retirados os tecidos a seguir: segmento lombossacral da medula espinal, tronco encefálico, cerebelo, todo o córtex cerebral, músculo esquelético sóleo e o osso fêmur. Todos os tecidos foram imediatamente pesados.

O sangue foi centrifugado a 1000 g, por 20 min, a 4 °C, em centrífuga refrigerada (Sorvall RC5B- Rotor SM 24). Após esse procedimento, o plasma foi coletado, aliquotado e armazenado à temperatura de -80 °C.

O segmento lombossacral da medula espinal foi dividido em três partes. Uma das partes foi utilizada para a determinação da SAG. A segunda parte foi usada para a determinação dos valores de H₂O₂. Essas duas partes foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas intactas à temperatura de -80 °C. A terceira parte da medula espinal, assim como as regiões encefálicas, foram homogeneizadas e usadas nas análises dos outros parâmetros oxidativos. A homogeneização foi realizada em solução contendo cloreto de potássio (KCl) 1,15% e fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF) 100 mM, seguida de centrifugação a 1000 g, por 20 minutos, à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado à -80 °C.

Cabe destacar que a mesma parte da medula espinal recebeu sempre o mesmo tratamento. Ainda, sempre foram coletadas amostras das mesmas regiões em todos os tecidos.

4.5 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

4.5.1 GERAÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO (SAG)

A SAG foi estimada pela redução de azul de nitrotetrazol (NBT), conforme técnica descrita por WANG et al. (1998). O método constituiu na reação de cortes da medula espinal com NBT após incubação de 90 minutos, para formação de formazan, o indicador da formação do O₂^{•-}. A absorvância do formazan foi determinada espectrofotometricamente a 540 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). A quantidade de formazan reduzido pelo O₂^{•-} foi calculada com o emprego da fórmula a seguir:

$$\text{Redução a formazan} = A \times V (T \times Wt \times \epsilon \times l)$$

Na fórmula, o A representa a absorvância do formazan, V o volume de solução, T o período de incubação das amostras com NBT, Wt o peso do tecido, ϵ o coeficiente de extinção molar (0,72 L.mmol⁻¹.mm⁻¹), e l representa o caminho óptico. Os resultados foram expressos em picomol por minuto por miligrama de peso do tecido.

4.5.2 PERÓXIDO DE HIDRÓGENIO (H₂O₂)

O ensaio para mensurar o H₂O₂ se baseou na oxidação do vermelho de fenol por H₂O₂ mediado pela peroxidase de rabanete. O ensaio foi conduzido conforme técnica descrita por PICK & KEISARI (1980), com pequenas modificações (SCHEID et al, 2018). Para tanto, fatias finas de medula espinal foram incubadas em tampão dextrose-fosfato (5 mM-10 mM, pH = 7,0) por 30 minutos, sob agitação. Após este período, o meio de incubação foi coletado e adicionado à solução contendo vermelho de fenol (0,28 mM) e peroxidase de rabanete (8,5 U/mL). Após 5 minutos de incubação, adicionou-se à mistura hidróxido de sódio (1,0 M) e se realizou a leitura da absorbância, em comprimento de onda de 610 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). Os resultados foram expressos em µmol de peróxido por grama de tecido.

4.5.3 HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS

O método xilenol laranja (XO), descrito por JIANG et al. (1991) e adaptado por SODERGREN et al. (1998), se baseia na oxidação do Fe⁺² a Fe⁺³ na presença de lipoperóxidos, em pH ácido, formando complexos de Fe⁺³xilenol laranja. Em solução ácida, o corante mostra pico a 560 nm e a absorbância cresce linearmente com o aumento da concentração do corante.

As amostras de tecidos foram diluídas, em proporção de 1:10, e separadas em 2 grupos: no primeiro foi acrescentado metanol absoluto (MEOH), e no segundo, trifetilfosfina (TEP) 10 mmol/L. Ambos os grupos foram incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após a incubação, foi pipetado, em microplaca, 10 µl de amostra em quadruplicata (uma duplicata com o metanol, e outra duplicata com o TEP), adicionando-se em seguida 90 µl do reagente de trabalho (RT-XO). Este consistiu em uma mistura de 81% de MEOH 90%, XO 2 mmol/L para concentração final de 100 µM, H₂SO₄ 1 mmol/L para concentração final de 25 mmol/L, BHT 40 mmol/L para concentração final de 4 mmol/L e sulfato ferroso amoniacal 10 mmol/L para concentração final de 250 µmol/L.

A placa foi agitada por 30 minutos, em temperatura ambiente e, em seguida, se realizou a leitura em leitora de placas a 570 nm (Zenyth 200, BiochromInc, UK). Para os cálculos, foram descontados os valores de absorbância com TEP dos valores obtidos das duplicatas com MEOH. O resultado foi expresso em µmol por grama de tecido.

4.5.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

O método da capacidade antioxidante total (TAC), adaptado de EREL (2004), consistiu no branqueamento da cor característica do reagente 2,2'-azinobis(3-etilbenzo-tiazolina-6-sulfonato) (ABTS⁺⁺) pelos antioxidantes presentes na amostra. Esta reação foi monitorada espectrofotometricamente a 660 nm e a taxa de branqueamento é inversamente relacionada à TAC da amostra. A velocidade da reação foi calibrada com Trolox, que é largamente utilizado como um padrão para os ensaios de medição tradicional de capacidade antioxidante. Os resultados foram expressos em equivalentes de μmol de Trolox por grama de tecido ($\mu\text{mol}\cdot\text{eqtrolox/g}$ tecido). O ensaio tem uma excelente precisão, superior a 97%.

4.5.5 CONTEÚDO DE TIÓIS TOTAIS

A medida de tióis totais foi conduzida conforme descrito por AKSENOV & MARKESBERY (2001). Para tanto, a amostra foi misturada a tampão PBS/EDTA (pH= 7,5) e a ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzólico) (DTNB, 10 mM). Após 30 minutos de incubação, à temperatura ambiente, as absorvâncias foram lidas a 412 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). A medida de TNB formado foi calculada conforme a fórmula:

$$\text{TNB} = (A_{412} - A_{412\text{sem proteína}} - A_{412\text{sem DTNB}}) / \Delta_{412\text{TNB}}, \text{ onde:}$$

$\Delta_{412\text{TNB}} = 14.150 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, A_{412} é a absorvância da amostra; $A_{412\text{sem proteína}}$ é a absorvância do meio reacional sem amostra; $A_{412\text{sem DTNB}}$ é a absorvância do meio sem DTNB. Os resultados foram expressos em mmol/mg tecido.

4.5.6 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A atividade da enzima SOD foi determinada conforme ensaio proposto por FRIDOVICH & MISRA (1972), cujo método consiste em avaliar indiretamente a ação desta enzima, que ao neutralizar os radicais superóxido gerados durante a auto-oxidação da adrenalina reduz a formação de adrenocromo, um subproduto colorido desta auto-oxidação e que pode ser medido em comprimento de onda de 480 nm.

Inicialmente realizou-se uma leitura temporal das absorvâncias (Espectrofotômetro T60, PG Instruments) da adrenalina (60 mM, pH= 2), em meio contendo tampão glicina (pH= 11,3). Em pH elevado a auto-oxidação é favorecida e o equipamento registrou a formação de adrenocromo característica. Em seguida, realizou-se a leitura da absorvância das amostras, cada qual nos volumes de 15 e 30 µL em presença de 50 µL de adrenalina. Neste caso, em função da presença de SOD nas amostras, menos adrenocromo foi formado. O ensaio proporciona uma medida indireta da atividade enzimática, e por isso os resultados foram expressos em unidades de SOD por miligrama de proteína, que representou a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a velocidade de auto-oxidação da adrenalina.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantificação de proteínas foi realizada pelo método colorimétrico descrito por LOWRY et al. (1951), em espectrofotômetro SP-22, BIOSPECTRO, em comprimento de onda de 625 nm. O conteúdo de proteínas da amostra foi calculado com base nas absorvâncias desta e de um fator de calibração obtido de uma curva-padrão de albumina.

4.7 ESTIMATIVA DA PERDA DE MASSA MUSCULAR ESQUELÉTICA

Para se estimar a perda de massa muscular esquelética durante o envelhecimento, se calculou a razão entre o peso do músculo sóleo e o peso corporal obtido previamente à morte de cada rato, conforme descrito por ALTUN et al. (2007).

4.8 PARÂMETROS PLASMÁTICOS

O plasma foi utilizado na análise da concentração de glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL colesterol. As determinações foram realizadas por meio de *kits* comerciais (LABTEST), seguindo as recomendações do fabricante.

4.9 RAIIO-X DO FÊMUR

Para a análise radiográfica do fêmur, esse osso foi cuidadosamente liberado dos tecidos adjacentes imediatamente após sua retirada do rato. O fêmur limpo foi congelado a -80°C até sua análise. No dia do raio-X, cada fêmur foi posicionado ao longo de seu eixo maior, de modo a possibilitar imagens dorsoventral e mediolateral do osso (Figura 7). As radiografias foram realizadas na Clínica Veterinária AMAVET- Laboratório e Imagem, situado em Porto Alegre/RS, com o emprego do aparelho de raio-X de 100 mA, 45 kV, 0,01s (IRay Technology, Model Mars 1417.PSI, Shangai, China). A análise das imagens radiográficas foi feita com o uso do software I-Ray Vet (I-Ray Technology, Xangai, China). Os seguintes parâmetros foram usados nas avaliações: comprimento e largura do fêmur; espessura do osso cortical em suas regiões medial e lateral, e espessura total da cortical (lateral+medial); largura da cavidade medular; radiolucência; radiopacidade; remodelamento no colo do fêmur; presença de esclerose no osso cortical e cavidade medular; fratura; e ocorrência de osteófito. As medidas foram tomadas da cabeça femoral aos côndilos femorais e do aspecto medial para o lateral. As medidas da largura da cortical e da cavidade medular foram tomadas sempre na região mediana da diáfise.

As radiografias foram avaliadas por um veterinário com formação e experiência em radiologia veterinária. O veterinário era cego aos grupos experimentais.

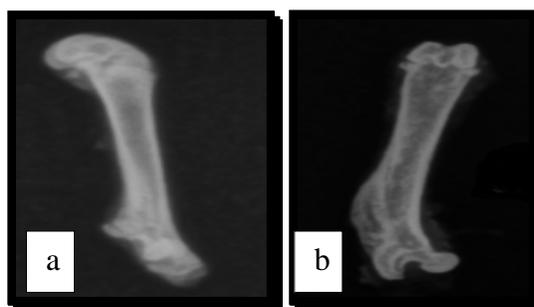


Figura 7: Radiografias do osso fêmur direito de rato Wistar adulto, em vista lateral para medial (a) e frontal (b), em direções dorsoventrais.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Previamente a realização do estudo se fez o cálculo do “n” (número mínimo de animais) utilizando o software WIN PEPI, versão 9.1. Este cálculo foi baseado em dados prévios comportamentais e de morfometria e imunoistoquímica no complexo nuclear vestibular de encéfalos de ratos e humanos jovens e envelhecidos (ALVAREZ et al., 2000; TANG et al., 2002; VILLARREAL et al., 2002; ALTUN et al., 2007; FERNÁNDEZ et al., 2007; SCHWARZ et al., 2009). Foi estabelecido um nível de significância de 0,05, poder estatístico de 95%, assumindo uma perda de 20% para esse estudo. A análise resultou em número amostral de 8 (oito) ratos por grupo experimental. Contudo, alguns ratos morreram ao longo do envelhecimento. Assim, o tamanho amostral final foi 5 ou 6 ratos por grupo experimental, exceto para ratos de 30 meses de idade, cujo tamanho amostral final foi 3.

Para a análise estatística, os dados de ratos sedentários foram comparados entre as diferentes idades para mostrar o efeito do envelhecimento. Os dados de ratos treinados foram comparados a ratos sedentários para mostrar o efeito do exercício regular de baixa intensidade em ratos com diferentes idades. Para ambas as comparações, os dados foram analisados por dois pesquisadores independentes, um dos quais era cego aos grupos experimentais. Quando houve inconsistência nos resultados dos dois pesquisadores, um terceiro pesquisador analisou os dados, e o resultado final foi a média dos resultados obtidos pelos três pesquisadores.

As análises estatísticas foram realizadas usando SigmaPlot versão 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL) ou Prism 5.03 (GraphPad Software, San Diego, CA) para Windows. A distribuição gaussiana normal dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk, enquanto o teste de Levene foi usado para analisar a homogeneidade da variância. Para analisar o efeito do envelhecimento, os dados dos parâmetros metabólicos (glicemia, triglicerídeos, colesterol total e HDL colesterol) e do teste da barra estreita foram analisados mediante emprego do teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. Os dados de peso corporal, razão entre peso do músculo sóleo e peso corporal, teste de marcação das patas e os dados dos biomarcadores oxidativos foram analisados mediante emprego do teste de análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do pós-teste de Tukey. O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para analisar a correlação entre o peso corporal e a razão entre peso do sóleo e peso corporal. Para analisar o efeito do treino, os dados (exceto aqueles de peso corporal) foram analisados mediante

emprego do teste de ANOVA de duas vias (fatores: idade e treino) seguido do pós-teste de Tukey. Os dados do peso corporal foram analisados usando ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando a análise estatística apresentou $P < 0,05$. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão.

4.14 DISPOSIÇÃO FINAL DOS RESÍDUOS DA PESQUISA

4.14.1 RESÍDUOS QUÍMICOS

Os resíduos químicos foram acondicionados em embalagens adequada, previamente identificadas e encaminhados ao Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para procedimento correto de sua eliminação.

4.14.2 RESÍDUOS BIOLÓGICOS

O lixo biológico, após acondicionamento correto e identificação, foi encaminhado ao CREAL do Instituto de Ciências Básicas da Saúde para sua devida eliminação.

5. RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1

Este artigo mostra as variações relacionadas à idade e os efeitos do exercício físico de baixa intensidade sobre a marcha e o equilíbrio em ratos wistar machos. É mostrado ainda o efeito do envelhecimento e do exercício físico regular sobre a atividade de biomarcadores de estresse oxidativo em medula espinhal. Ainda, o artigo mostra os efeitos do avanço da idade e do exercício físico sobre peso corporal, valores plasmáticos de glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL colesterol, e relação entre peso do músculo sóleo e peso corporal.

Este artigo foi publicado na Revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* em junho de 2019.

Citação do artigo: E.M.S. Silveira, A. Kroth , M.C.Q. Santos , T.C.B. Silva , D. Silveira, A.P.K. Riffel, T. Scheid, M. Trapp, and W.A. Partata. Age-related changes and effects of regular low intensity exercise on gait, balance, and oxidative biomarkers in the spinal cord of Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* , 2019, 52(00): e8429.



Age-related changes and effects of regular low-intensity exercise on gait, balance, and oxidative biomarkers in the spinal cord of Wistar rats

E.M.S. Silveira¹, A. Kroth², M.C.Q. Santos¹, T.C.B. Silva¹, D. Silveira¹, A.P.K. Riffel¹,
T. Scheid¹, M. Trapp¹, and W.A. Partata¹

¹Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

²Área de Ciências da Vida, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba, SC, Brasil

Abstract

The present study aimed to analyze age-related changes to motor coordination, balance, spinal cord oxidative biomarkers in 3-, 6-, 18-, 24-, and 30-month-old rats. The effects of low-intensity exercise on these parameters were also analyzed in 6-, 18-, and 24-month-old rats. Body weight, blood glucose, total cholesterol, and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol were assessed for all rats. The soleus muscle weight/body weight ratio was used to estimate skeletal muscle mass loss. Body weight increased until 24 months; only 30-month-old rats exhibited decreased blood glucose and increased total cholesterol and HDL cholesterol. The soleus muscle weight/body weight ratio increased until 18 months, followed by a small decrease in old rats. Exercise did not change any of these parameters. Stride length and step length increased from adult to middle age, but decreased at old age. Stride width increased while the sciatic functional index decreased in old rats. Performance in the balance beam test declined with age. While gait did not change, balance improved after exercise. Aging increased superoxide anion generation, hydrogen peroxide levels, total antioxidant capacity, and superoxide dismutase activity while total thiol decreased and lipid hydroperoxides did not change. Exercise did not significantly change this scenario. Thus, aging increased oxidative stress in the spinal cord, which may be associated with age-induced changes in gait and balance. Regular low-intensity exercise is a good alternative for improving age-induced changes in balance, while beneficial effects on gait and spinal cord oxidative biomarkers cannot be ruled out because of the small number of rats investigated (n=5 or 6/group).

Key words: Superoxide anion generation; Hydrogen peroxide; Total thiol content; Lipid hydroperoxide levels; Total antioxidant capacity; Superoxide dismutase

Introduction

Aging is a complex event characterized by a gradual decline of physiological functions and increased susceptibility to disease (1). Among the various theories that attempt to explain the aging process, disruption of the entire signaling network involving reactive oxygen species (ROS) has received increasing recognition over the past two decades (2).

ROS include singlet oxygen, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and hydrogen peroxide (H₂O₂), which are generated as part of normal cell metabolism and have both normal physiological and pathophysiological functions (3). Excessive ROS formation can induce oxidative stress, leading to cell damage. Therefore, cells possess antioxidant networks that scavenge excessive ROS. Thiols constitute the majority of total body antioxidants and play a significant role in defense against ROS. The

antioxidant defense system also includes specific enzymes. The enzymes used to detoxify ROS include superoxide dismutase (SOD), which converts superoxide radicals into H₂O₂ (3).

Aging particularly affects the functioning of the central nervous system (CNS). During aging, the CNS experiences ultrastructural modifications, biochemical deficits, inflammatory changes, and impairment of memory, cognition, and locomotor functions linked to oxidative stress (1). The CNS consists of the brain and spinal cord, which compose a single continuous structure. However, mitochondria of the spinal cord have different bioenergetics than those of the brain (4). According to the authors, spinal cord mitochondria appear to produce more ROS and cause more oxidative damage than do age-matched brain mitochondria. Yonutas et al. (4) also observed that ROS

Correspondence: E.M.S. Silveira: <elzamss@yahoo.com.br>

Received December 28, 2018 | Accepted May 16, 2019

production appears to increase by 200 to 600% in the CNS of old Sprague-Dawley rats compared to young rats, specifically in the cortex and in the cervical, thoracic, and lumbar regions of the spinal cord. However, ROS production in this study was assessed using DCF fluorescence. Probes, such as DCF, react strictly by radical mechanisms, and positive responses indicate that radicals, or metal/peroxide complexes capable of undergoing single electron reactions, are being produced (5). Therefore, it appears important to determine the specific changes in ROS with aging. This knowledge will not only improve the understanding of the effects of aging, but will also increase the possibilities of identifying specific mechanisms involved in the aging process.

However, aging also changes the antioxidant system of the spinal cord. The immunoreactivity of SOD, for example, was found to increase in the spinal cord of aged dogs (6). The levels of total thiol, non-protein thiol, and protein thiol were found significantly decreased in the spinal cord of 24–26-month-old rats relative to 3–4-month-old rats (7). However, the gradual changes that occur to SOD activity and total thiol content of the rat spinal cord remain unknown.

Regular physical activity has beneficial effects on age-induced oxidative changes. Exercise programs appear to trigger activation of ROS removal systems in the CNS of young and old rodents (8,9), with the effects seeming to depend on the type of exercise (8). Nevertheless, the effects of regular low-intensity exercise on ROS formation and antioxidants in the rodent spinal cord remain unknown. Recent research demonstrated that low-intensity exercise improved motor function in patients with early-stage Parkinson's disease, especially akinesia (10).

In order to gain insight into previously raised questions, the purpose of this study was to investigate: 1) age-related changes in motor coordination, balance, and spinal cord oxidative biomarkers in 3-, 6-, 18-, 24-, and 30-month-old rats; and 2) the effects of low-intensity exercise on these parameters in 6-, 18-, and 24-month-old rats.

Material and Methods

Experimental animals

All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS #29386), with efforts made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used. To characterize the effect of aging and regular low-intensity exercise on spinal cord biomarkers, 47 intact 3-month-old male Wistar rats were obtained from a colony maintained by Universidade Federal do Rio Grande do Sul. In the laboratory, the rats were housed in groups of three per conventional cage, maintained at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, exposed to a 12-h light/12-h dark photoperiod and provided free access to food and water. Six ($n=6$) of the rats were acclimated for

one week and killed by decapitation. The other rat groups were maintained under laboratory conditions until the ages of 6 ($n=12$), 18 ($n=12$), 24 ($n=12$), and 30 ($n=5$) months. All rats were kept under close observation and weighed regularly, including prior to sacrifice. Since some rats died of natural causes, the final number of experimental animals was 12 for 6 months, ten for 18 and 24 months, and three for 30 months.

Exercise protocol

To characterize the effect of regular low-intensity exercise on gait, balance, and spinal cord oxidative biomarkers, half of the 6-, 18-, and 24-month-old rats were randomly selected for an exercise program (exercise rats) at ages of 3, 15, and 21 months, respectively. Since there were only three 30-month-old rats at 27 months, use of these rats in the exercise program was limited. Non-exercise rats remained sedentary.

Prior to initiating the exercise program, the exercise groups were familiarized with a treadmill for one week, 3 times/week, 30 min/day. Having successfully performed the exercise protocol, the rats began the exercise program. The exercise protocol consisted of running on a treadmill designed for human use (Runner, Brazil), but modified for use by rats, for 30 min/day, 3 times/week, for 12 weeks, as described by Sim et al. (11) with some modifications (12). Each session included a warm-up period of 5 min at 2 m/min, then exercise for 5 min at 5 m/min and 20 min at 8 m/min, while the incline was maintained at 0%.

The 12-week exercise program was executed until ages of 6, 18, and 24 months for rats that started at 3, 15, and 21 months, respectively. Exercise was performed only three times a week to avoid chronic stress, inflammation, or muscle damage, and to allow the liver and muscle to recover glycogen; rats received no stimulation (aversive or appetitive) to motivate them to run (12). The duration of 12 weeks was chosen because long-term treadmill exercise was previously shown to be beneficial for the spinal cord (9). The treadmill was thoroughly cleaned between each session.

All rats were sacrificed at the same time of day (beginning at 8:00 am), without fasting. The animals were classified as young adult (3 months), adult (6 months), middle-aged (18 months), young elderly (24 months), and old (30 months) (13,14). These ages were chosen because ages of 6, 18, 24, and 30 months correspond to human ages of 18, 45, 60, and 75 years, respectively (15).

Functional assessment

To assess sensorimotor deficits, two standard behavioral tests were employed to evaluate motor coordination and balance of rats at defined ages throughout their lifespan: the footprint test and the balance beam test. The footprint test was used to assess stride and step lengths, stride width, and the sciatic functional index (SFI). The balance beam test was used to test the ability to maintain

balance while traversing a narrow beam to reach a safe platform.

The footprint test was employed as described by Bloom et al. (16) (to assess stride, step lengths, and stride width) and by de Medinaceli et al. (17) (to assess SFI). Briefly, rats were habituated to the testing apparatus one day prior to starting experimental tests. The apparatus was composed of an open field illuminated by a light (60 W) in which a runway (8.5cm wide, 100cm long, borders 18.5cm high) was arranged leading into a dark wooden box (18 × 16 × 18 cm). For testing, the fore paws of the rat being tested were pressed on a red inepad to dye it, and the hind paws were dyed black. The rat was then allowed to walk across a sheet of paper lining through the illuminated open field leading to the dark box, thus leaving their footprints.

Stride length was defined as the distance between the center of a hind paw strike and the center of the next contact of the same paw on the runway. Step length was defined as the distance between a hind paw strike and the strike of the opposite hind paw. No distinction was made between the left and right measurements for stride and step lengths. Stride width was defined as the distance from the center of a left hind paw strike and the center of the right hind paw strike.

Rat footprints were used to determine the following measurements for the SFI: 1) distance from heel to the third toe (print length, PL); 2) distance from the first to the fifth toe (toe spread, TS); and 3) distance from the second to the fourth toe (intermediate toe spread, ITS). These three measurements were obtained from the left (L) and right (R) paws. Several prints of each foot were obtained on each track, but only three prints of each foot were used to determine the mean measurement for a side. The SFI was calculated using these measurements as: $SFI = -38.3 (LPL-RPL) / RPL + 109.5 (LTS-RTS) / RTS + 13.3 (LITS - RITS) / RITS - 8.8$. The result was considered an index of the functional condition of the sciatic nerve, with zero (± 11) representing normal function, and about 100 representing the loss of function.

For gait analysis, the mean value for each variable was calculated for each rat, which was then used to calculate a group mean. All functional measurements were measured manually by two researchers, one of which was blinded to the experimental groupings.

The balance beam test was used as described by Prasad and Muralidhara (18) with minor modifications (19). Briefly, rats were habituated to the testing apparatus one day prior to starting experimental tests. Animals were trained to traverse a 150-cm long narrow wooden beam placed horizontally 60 cm above the floor. The beam extended from a platform at one end to a wooden box (23 × 23 × 20 cm) at the other, and was divided into three 50-cm segments (1, 2, and 3). Testing involved recording, by two cameras placed at the platform end of the beam, the number of foot slips off the beam as the rat walked

from the platform to the wooden box. The video recordings provided left and right views of the rats as they traversed the beam and provided images for determining the number of foot slips. Scoring ranged from 0 to 8, with a score of 0 for a rat that traversed the beam without foot slips; a score of 1 for a rat that a foot slipped off in the third segment; a score of 2 for a rat that a foot slipped off in the second segment; a score of 3 for a rat that a foot slipped off in the first segment; a score of 4 for a rat that a foot slipped off in the first and second segments; a score of 5 for a rat that a foot slipped off in the first and third segments; a score of 6 for a rat that foot slipped off in the second and third segments; a score of 7 for a rat that a foot slipped off in the first, second, and third segments; and a score of 8 for a rat that did not complete the test.

The balance beam test was also performed to assess the amount of time taken to traverse the beam (in seconds). Score and time were determined for each animal by three researchers, two of which were blinded to the experimental groupings. The mean of the three readings was taken as the score for the animal.

All rats were subjected to a full behavioral test battery prior to sacrifice. The functional tests were conducted at the same time of day (7:00 am) by the same researcher, starting with the balance beam test followed by the footprint test. Two researchers were always present throughout each session, and the behavioral test protocols were highly standardized and maintained over time.

Sample preparation

Rats were sacrificed by decapitation, and blood, soleus muscle, and the lumbosacral spinal cord were promptly collected. The blood was centrifuged at 1000 g for 20 min at 4°C and the plasma used to determine glucose, triglycerides, total cholesterol, and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol. Commercially available kits (LABTEST, Brazil) were used for these assays. Triglycerides were assessed because their levels are inversely correlated with executive function in non-demented elderly adults after controlling for age, vascular risk factors, and fiber tract integrity (20).

The soleus muscle and spinal cord were immediately weighed. The ratio of the soleus muscle weight divided by body weight obtained immediately before death was used to estimate the loss of skeletal muscle mass with age as described by Altun et al. (13).

The spinal cord segment was divided transversely into three parts. The same part of each segment always received the same preparation. Two parts were cooled in liquid nitrogen and processed to determine superoxide anion generation (SAG) and H₂O₂ levels. A third part was homogenized in 1.15% KCl diluted 1:5 (w/v) containing 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, centrifuged at 1000 g for 20 min at 4°C, and the supernatant was used for assays of total thiols, SOD activity, total antioxidant capacity (TAC), and lipid hydroperoxides levels.

Antioxidant parameters

Total thiol content was determined as described by Aksenov and Markesbery (21). Briefly, 30 μL of a spinal cord sample was mixed with 1 mL of phosphate/EDTA buffer, pH 7.5, and 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB, 10 mM). Control samples, which did not include DTNB, were run simultaneously. The absorbance was read at 412 nm after 30 min of incubation at room temperature, and the results are reported as mmol/mg tissue.

Total antioxidant capacity was determined with 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation, which, in an acid medium, is decolorized by antioxidants, according to their concentration and antioxidant capacity (22). Results are reported in $\mu\text{mol} \cdot \text{eq} \cdot \text{trolox}^{-1} \cdot \text{g tissue}^{-1}$.

SOD activity was measured based on its action to neutralize superoxide radicals to prevent oxidation of adrenaline to adrenochrome, a colored by-product that can be measured at 480 nm. The reaction medium contained glycine buffer (50 mM, pH 11.3) and adrenaline (60 mM, pH 2.0), and the results are reported as units per milligram of protein (23).

Pro-oxidant parameters

SAG was estimated by using the reduced nitroblue tetrazolium (NBT) method of Wang et al. (24). Briefly, sections of fresh tissue from the lumbosacral spinal cord were mixed with NBT to form formazan as an index of superoxide anion generation. The absorbance of formazan was determined spectrophotometrically at 540 nm. The quantity of NBT reduction = $A \times V / (T \times Wt \times \Sigma \times l)$, where A is the absorbance of blue formazan at 540 nm, V is the volume of the solution, T is the time period (90 min) during which the rings were incubated with NBT, Wt is the blotted wet weight of the spinal cord portion, Σ is the extinction coefficient of blue formazan (i.e., $0.72 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{mm}^{-1}$), and l is the length of the light path. Results are reported as reduced NBT $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg tissue}^{-1}$.

To measure H_2O_2 levels, horseradish peroxidase (HRPO)-mediated oxidation of phenol red by H_2O_2 was used, which leads to the formation of a compound that absorbs at 610 nm. Sections of fresh tissue from the lumbosacral spinal cord were incubated for 30 min at 37°C in 10 mM phosphate buffer (140 mM NaCl and 5 mM dextrose). The supernatants were transferred to tubes with 0.28 mM phenol red and 8.5 U/mL HRPO. After 5 min of incubation, 1 mol/L of NaOH was added and the solution read at 610 nm. The results are reported as $\mu\text{mol} \text{H}_2\text{O}_2/\text{g tissue}$ (25).

The lipid hydroperoxides were measured by oxidation of Fe^{2+} by LOOH in an acid medium containing xylenol orange dye, which forms a complex with Fe^{3+} , as described by Jiang et al. (26). Results are reported as $\mu\text{mol/g tissue}$.

Statistical analysis

The sample size for the present study was based on previous studies using WinPepi software version 9.1

(Professor Joe Abramson, author of WinPepi, <http://www.epi-perspectives.com/content/8/1/1>), a significance level of 0.05 and 95% power, which resulted in a sample size of eight rats per group. However, some rats died during aging, so the final sample size was 5 or 6 rats per group, except for 30-month-old rats that had a sample size of 3 rats. Data from sedentary rats were compared between different ages to show the effect of aging. Data from exercise rats were compared to sedentary rats to show the effect of regular low-intensity exercise in rats with different ages. For both comparisons, the data were analyzed by two independent researchers, one of which was blinded to the experimental groupings. When there were inconsistencies in the results from the two researchers, a third researcher analyzed the data, and the final result was considered the mean of the results obtained by three researchers. Statistical analyses were performed using SigmaPlot version 11.0 (Systat Software Inc., USA) or Prism 5.03 (GraphPad Software, USA) for Windows. Normal Gaussian distribution of the data was analyzed by Shapiro-Wilk test, while Levene's test was used to analyze homogeneity of variance. To analyze the effect of aging, data for metabolic parameters (blood glucose, triglycerides, total cholesterol, and HDL cholesterol) and from the balance beam test were analyzed by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test. Body weight gain, soleus muscle weight/body weight ratio, footprint analysis, and oxidative biomarker data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. The Pearson correlation coefficient was used to analyze the correlation between body weight and soleus weight/body weight ratio. To analyze the effect of exercise, data (except for body weight) were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. Data of body weight were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test. Tests with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Since the rats were fed *ad libitum*, they continued to grow and gain weight throughout a considerable portion of their life. Weight gain occurred until 24 months for 24- and 30-month-old rats. Thirty-month-old rats experienced a small decrease (18%) in body weight. These rats also exhibited small decreases in body weight at 10 and 15 months. However, they did not show any change in their behavior or signs of alterations in their physiological functions at these time-points. The exercise program did not induce significant changes in body weight (Figure 1).

Blood glucose did not exhibit profound differences among ages, with no significant differences among 3-, 6-, 18-, and 24-month-old rats (Figure 2A). Blood glucose was slightly lower at 30 months, which was significant compared to that at 3 months. There was no significant difference in triglycerides among ages (Figure 2B). Total

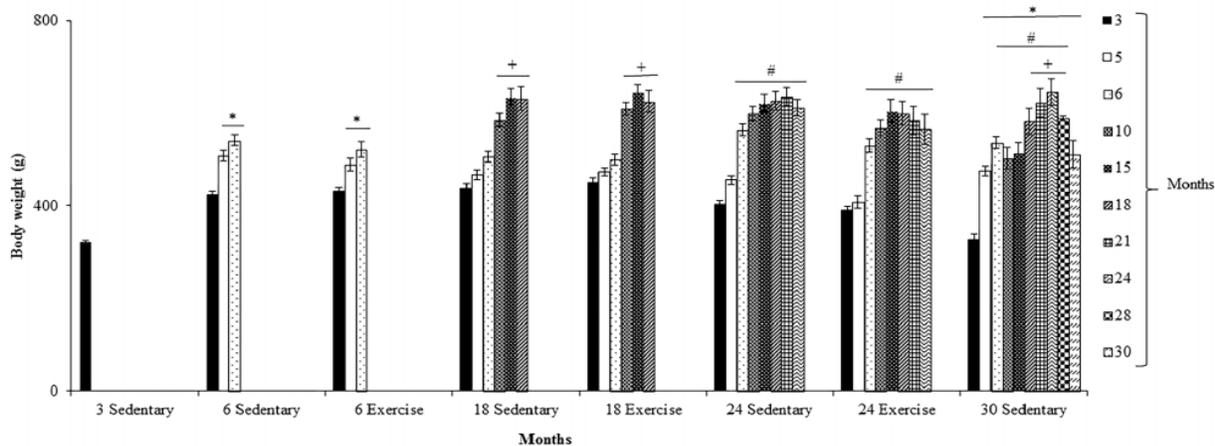


Figure 1. Body weight gain of sedentary Wistar rats 3, 6, 18, 24, and 30 months old and the effects of 12 weeks of treadmill running (Exercise) on this gain in rats 6, 18, and 24 months old. Data are reported as means \pm SE. * $P < 0.05$ compared to 3-month-old rats; + $P < 0.05$ compared to 3-, 5-, and 6-month-old rats; # $P < 0.05$ compared to 3- and 5-month-old rats (repeated-measures ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test).

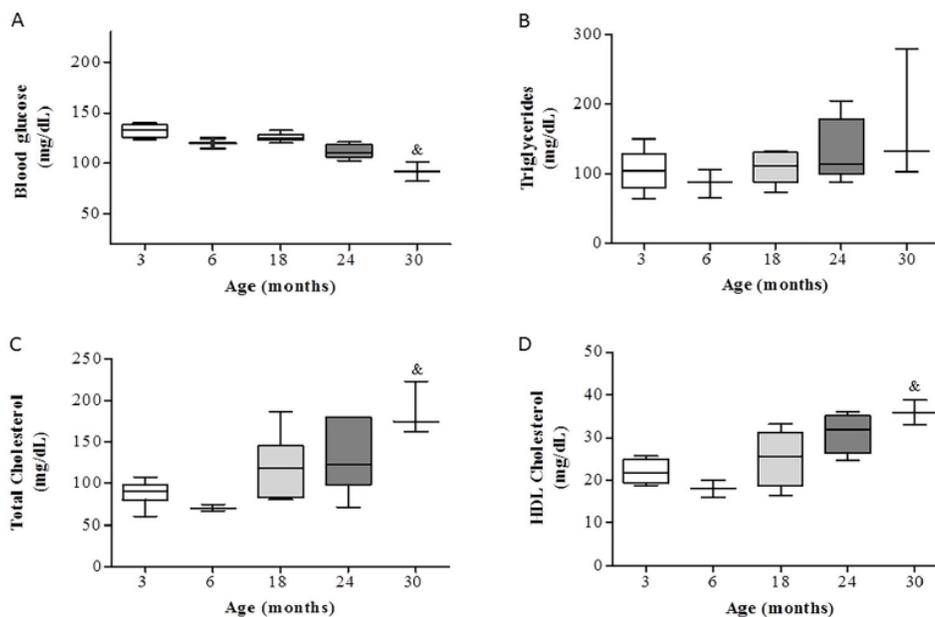


Figure 2. Blood glucose (A), triglycerides (B), total cholesterol (C), and high-density lipoprotein (HDL) cholesterol (D) of Wistar rats of different ages. Data are reported as medians and 10–90% interquartile ranges. & $P < 0.05$ compared to all groups (Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test).

cholesterol tended to be greater in older rats, but significantly so only at 30 months compared to 3 and 6 months (Figure 2C); a similar result was found for HDL cholesterol (Figure 2D). There were no significant changes in blood

glucose, triglycerides, total cholesterol, and HDL cholesterol with exercise.

The soleus weight (mg)/total body weight (g) ratio differed among ages. This ratio was significantly greater

for 6-, 18-, and 24-month-old rats compared to 3-month-old rats (Figure 3A). However, the ratio did not differ significantly between 30 months and 3 months. Although the ratio was approximately 12% lower at 24 months compared to 18 months, and 15% lower at 30 months than at 24 months, the differences were not significant. There was a significant negative correlation between body weight and soleus muscle weight/body weight ratio ($r=-0.732$, $P<0.005$; Figure 3B). The exercise program did not induce a significant change in the soleus weight (mg)/total body weight (g) ratio (Figure 3C).

Functional assessment

The assessed gait parameters differed among ages. Stride length was significantly greater (43%) for 6- and 18-month-old rats compared to 3-month-old rats (Figure 4A), but there was no significant difference between the former. Stride length also did not differ significantly between 3-month-old rats and 24- and 30-month-old rats. Interestingly, 30-month-old rats had a stride length similar to that of 3-month-old rats. Stride length was 10% lower at 30 months than at 24 months. Step length was significantly greater for 6-, 18-, and 24-month-old rats compared to 3-month-old rats (Figure 4B). Interestingly, step length was similar for 3- and 30-month-old rats. Stride width was 25% greater for 6-, 18-, and 24-month-old rats, and 50% greater for 30-month-old rats, compared to 3-month-old rats. Stride width was 20% greater for 30-month-old rats compared to 6-, 18-, and 24-month-old rats (Figure 4C).

The SFI differed among ages. Values of SFI did not differ significantly among 3-, 6-, and 18-month-old rats (Figure 4D), with the values being near zero, indicating normal sciatic nerve function. However, while SFI values were around -6 for 3-month-old rats, the values were approximately -9.5 for 6- and 18-month-old rats, indicating a decrease of about 48% for 6- and 18-month-old rats compared to 3-month-old rats. The SFI was significantly lower for 24- and 30-month-old rats (150 and 180%, respectively), compared to 3-month-old rats. The SFI was also significantly lower for 24- and 30-month-old rats (68 and 89%, respectively) compared to 6-month-old rats. None of the gait parameters exhibited significant changes after low-intensity exercise (Figure 5).

Balance beam test scores differed among ages. Three-month-old rats had scores ranging between 0 and 2, but with a median of 0, indicating that these rats had few foot slips from the beam. The scores for 6-month-old rats ranged between 1 and 2 (Figure 6A), while those for 18-month-old rats ranged widely, but with the median being mainly between 1 and 4. The 24- and 30-month-old rats had obvious problems traversing the beam, with scores for 24-month-old rats ranging between 5 and 8 while 30-month-old rats had a score of 8.

Time to traverse the beam differed among ages (Figure 6B). While the average time taken by 3-month-old rats to traverse the beam ranged between 5 and 7 s, the time for 6- and 18-month-old rats ranged from 10–20 s and 10–60 s, respectively. The median time for 24-month-old

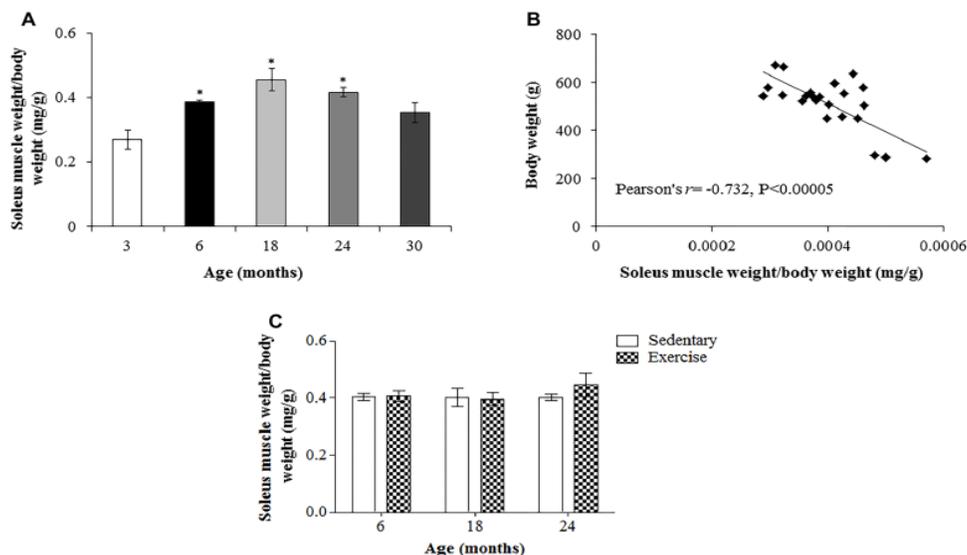


Figure 3. A, Ratio of soleus muscle weight (mg) to total body weight (g) of Wistar rats of different ages. B, Correlation between total body weight and soleus muscle weight/total body weight ratio. C, Effects of 12 weeks of treadmill running on soleus muscle weight (mg)/total body weight (g) ratio of aged rats. Data are reported as means \pm SE. * $P < 0.05$ compared to 3-month-old rats (repeated-measures (A) and two-way ANOVA (B) followed by Tukey's *post hoc* test).

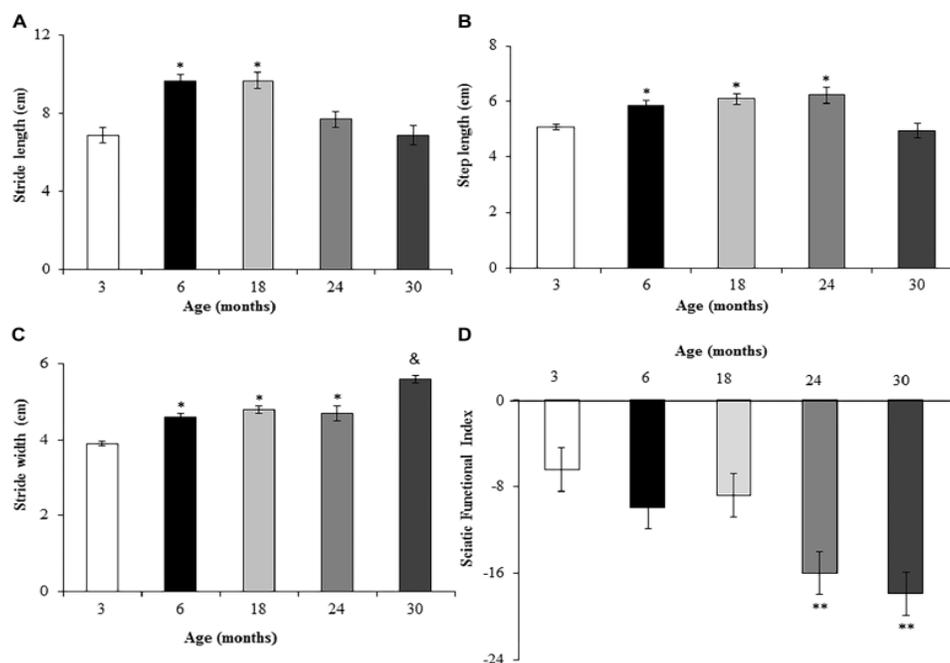


Figure 4. Assessment of stride length (A), step length (B), stride width (C), and sciatic functional index (D) of Wistar rats of different ages. Data are reported as means \pm SE. * $P < 0.05$ compared to 3-month-old rats; ** $P < 0.05$ compared to 3-, 6-, and 18-month-old rats; & $P < 0.05$ compared to all groups ($P < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test).

rats ranged between 30 and 60 s, while all 30-month-old rats failed to traverse the beam but were able to reach an average time of 90 s with the assistance of a researcher.

Regular low-intensity exercise significantly ameliorated the scores for rats in the balance beam test. After exercise, 6-month-old rats had scores between 0 and 1, which indicated an amelioration of 36% in this parameter compared to sedentary rats of the same age. The scores were 1 and 2 for 18-month-old rats and 1 and 6 for 24-month-old rats, which revealed an amelioration of 62 and 47%, respectively, compared to sedentary rats of the same age (Figure 6C). Time to traverse the beam did not differ significantly after exercise (Figure 6D).

Antioxidant parameters

Total thiol content of the spinal cord was lower for older ages (Figure 7A). Despite not being significant, total thiol content was about 33% lower in the spinal cord of 6-month-old rats compared to 3 months. Total thiol was also lower in the spinal cord of 18-month-old rats, although the difference (41%) was significant only compared to 3-month-old rats. Total thiol content was 12% lower at 18 months than at 6 months. Total thiol content was also significantly lower in 24- and 30-month-old rats compared

to 3. Total thiol content was 53% lower for 24-month-old rats compared to 3, and 21% lower compared to 18. The 30-month-old rats had lower total thiol content than 24-month-old rats, being approximately 93, 90, 88, and 85% lower compared to 3-, 6-, 18-, and 24-month-old rats, respectively. Total antioxidant capacity was low in the spinal cord of 3-month-old rats, and higher at 6, 18, 24, and 30 months (Figure 7B). The capacity at 6 months was 225% higher than that at 3 months, while at 18 and 24 months it was approximately 300% higher, and at 30 months 385% higher. The TAC was approximately 23% higher at 18 and 24 months compared to 6 months, and around 49% higher at 30 months. The TAC at 30 months was 21% higher than that at 24 months. SOD activity did not differ significantly between 3 and 6 months, but was higher at 18, 24, and 30 months compared to 3 months (Figure 7C), being 60, 115, and 165% higher, respectively. Interestingly, regular low-intensity exercise did not significantly change antioxidant parameters in the spinal cord of 6-, 18-, and 24-month-old rats (Figure 7D–F).

Pro-oxidant parameters

Pro-oxidant parameters differed among ages. The level of SAG was similar in the spinal cord of 3- and 6-month-old rats (Figure 8A). Despite not being significant,

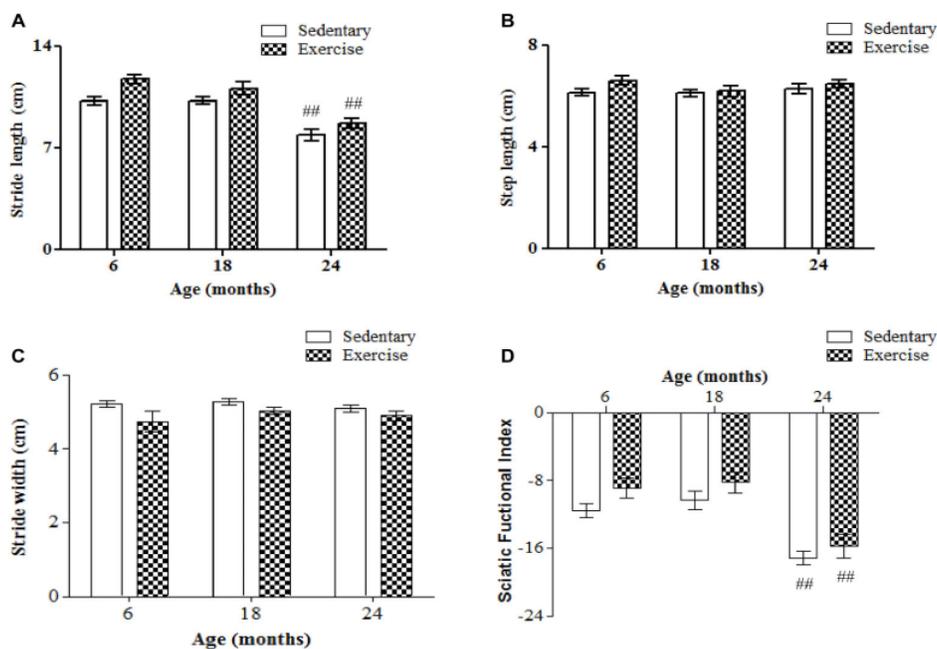


Figure 5. Assessment of stride length (A), step length (B), stride width (C), and sciatic functional index (D) of Wistar rats of different ages after 12 weeks of treadmill running. Data are reported as means \pm SE. ## $P < 0.05$ compared to 6- and 18-month-old rats (two-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test).

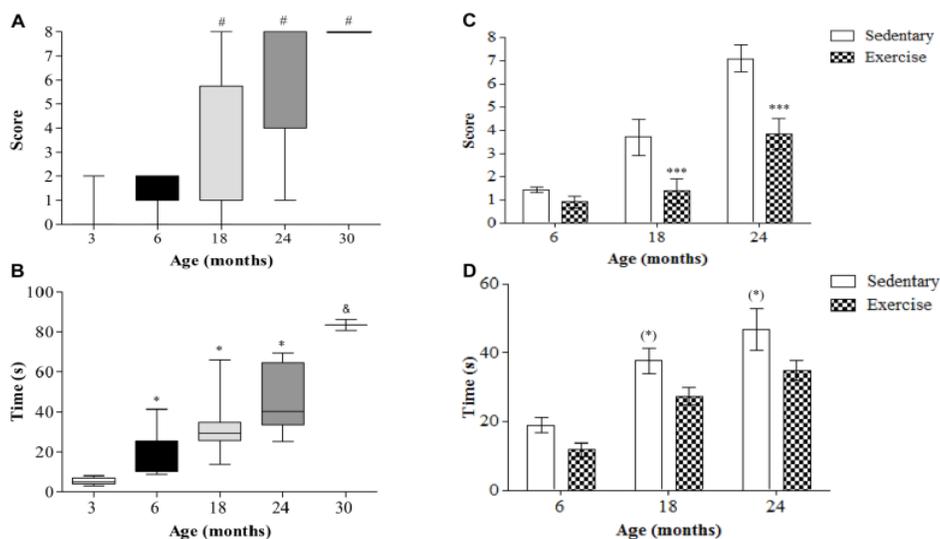


Figure 6. Responses to balance beam test in terms of total score (A,C) and total time to traverse the beam (B,D) for Wistar rats of different ages (A,B) and after 12 weeks of treadmill running (C,D). Data are reported as medians and 10–90% interquartile ranges (A,B) and means \pm SE (C,D). # $P < 0.05$ compared to 3- and 6-month-old rats; *** $P < 0.05$ compared to sedentary rats over the same age; * $P < 0.05$ compared to 3-month-old rats; (*) $P < 0.05$ compared to 6-month-old rats; & $P < 0.05$ compared to all groups (A and B, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post hoc* test and C and D, two-way ANOVA followed Tukey's *post hoc* test).

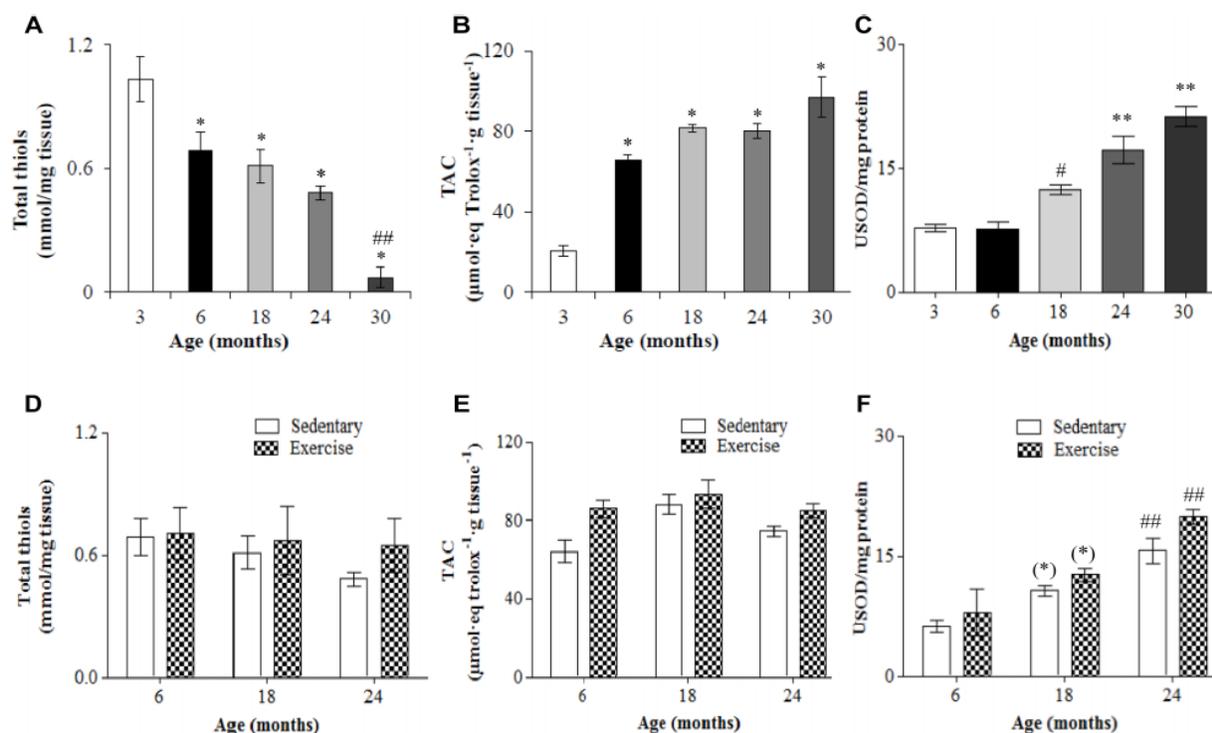


Figure 7. Total thiol content (A,D), total antioxidant capacity (TAC) (B,E), and superoxide dismutase (USOD) activity (C,F) in the lumbar spinal cord of Wistar rats of different ages (A–C) and after 12 weeks of treadmill running (D–F). Data are reported as mean \pm SE. * $P < 0.05$ compared to 3-month-old rats; # $P < 0.05$ compared to 3- and 6-month-old rats; ## $P < 0.05$ compared to 6- and 18-month-old rats; ** $P < 0.05$ compared to 3-, 6-, and 18-month-old rats; (* $P < 0.05$ compared to 6-month-old rats of the same experimental group (one-way (A–C) and two-way (D–F) ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test).

the level of SAG was 73% greater in the spinal cord of 18-month-old rats. This parameter increased significantly in the spinal cord at 24 and 30 months, being approximately 124% compared to 3 months, but 29% compared to 18 months. Levels of H_2O_2 were similar in the spinal cord at 3 and 6 months. This parameter was 125% greater in the spinal cord at 18 months, but not significantly so compared to 3 and 6 months (Figure 8B). Levels of H_2O_2 were similar in the spinal cord of 24- and 30-month-old rats; however, at 24 and 30 months, rats had higher levels of H_2O_2 (approximately 494%) compared to 3 months. The 24- and 30-month-old rats had approximately 164% greater H_2O_2 than 18-month-old rats. No significant differences were found among 3-, 6-, 18-, 24-, and 30-month-old rats for lipid hydroperoxides (Figure 8C). Exercise did not induce significant changes in pro-oxidant parameters (Figure 8D–F).

Discussion

The present study assessed metabolic parameters, motor coordination and equilibrium, and spinal cord oxidative

biomarkers in rats of different ages. The lack of changes in body weight, metabolic markers, and soleus muscle weight/body weight ratio with age was in line with previous studies (13,27,28). The slight decrease in blood glucose levels for old rats may be related to senescence; the median survival age for Wistar rats is 29–30 months (13). The maintenance of triglyceride levels during aging may be associated with diet. Rats were fed a standard diet throughout the entire experimental period, including prior to death. Fed aged rats did not experience changes in blood triglyceride levels (28). Thus, rats of the present study experienced changes that are commonly found during aging.

The age-induced changes in the balance-beam test and stride length were in line with previous research (13); however, those authors did not use 3-month-old rats. Thus, the results presented here add new information on these parameters in young rats. Interestingly, stride length was similar for 3- and 30-month-old rats. Recent research found longer stride lengths for middle-age rats than for 3-month-old rats (29), with the stride length from young rats similar to that found in the present study. This result

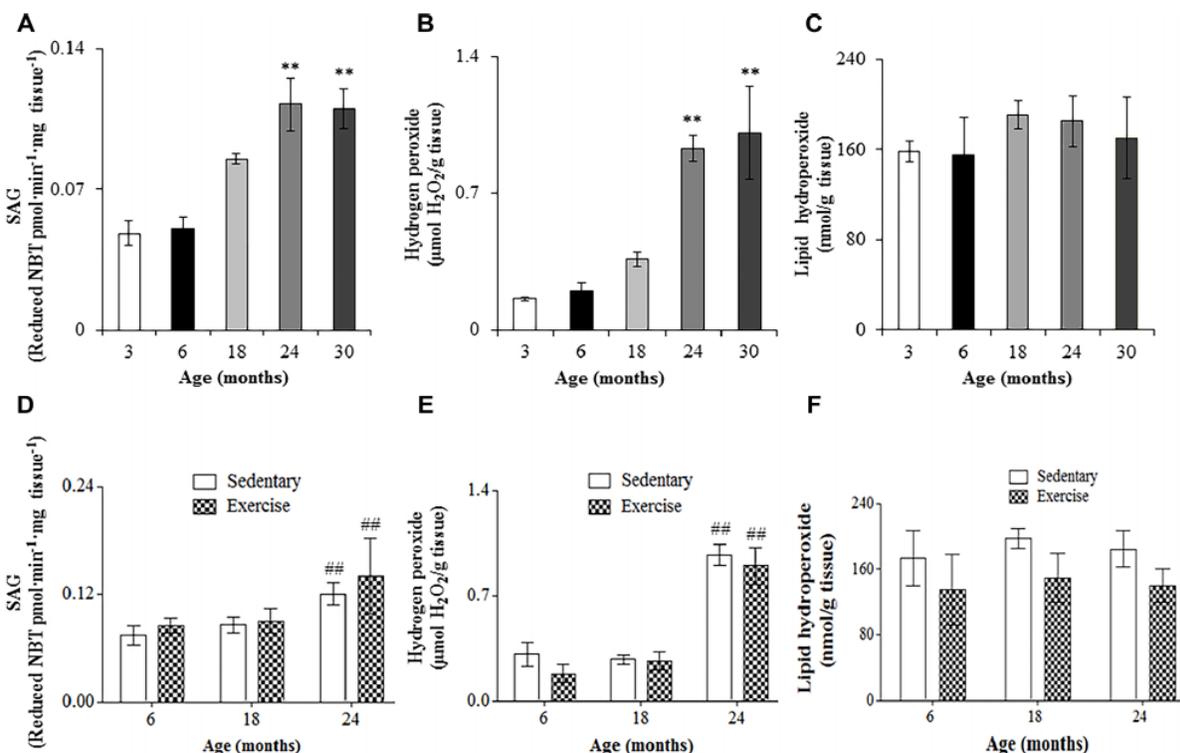


Figure 8. Superoxide anion generation (SAG) (A,D), hydrogen peroxide (B,E), and lipid hydroperoxide (C,F) levels in the lumbosacral spinal cord of Wistar rats of different ages (A–C) and after 12 weeks of treadmill running (D–F). Data are reported as mean \pm SE. ** $P < 0.05$ compared to 3-, 6-, and 18-month-old rats; ## $P < 0.05$ compared to 6- and 18-month-old rats (one-way (A–C) and two-way (D–F) ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test).

reinforces our measurements for all rats and shows that stride length returns to values similar to that found in young adult rats.

As with stride length, step length increased from young adult rats to middle age rats, but then decreased in old age. Interestingly, the step length found for 30-month-old rats was similar to that found for 3-month-old rats. Thus, stride and step length returned to values found at 3 months in spite of the difference in body size and weight.

In contrast, stride width increased with advancing age, with old rats having the greatest stride width. Since a stable gait requires control of the position of the center of mass of the body relative to the base of support (30), greater stride width may be a compensatory strategy to keep the center of mass of the body within the base of support in old rats.

The present study is the first to demonstrate that SFI changes with age. This index provides a very precise and reliable measure of the sciatic nerve condition and is quickly and easily applied to large populations (16). These authors reported an SFI near zero for normal young rats. We also found SFI values near zero for 3-, 6-, and

18-month-old-rats, but lower values for 24- and 30-month-old rats. Since SFI is very sensitive to lesion in this nerve (16), the decreased SFI found in 24- and 30-month-old rats in the present study indicates sciatic nerve lesion. In fact, morphological changes were found in peripheral nerves of 10- and 24-month-old Wistar rats (31).

Parallel to behavioral changes, the levels of SAG and H₂O₂ increased in the spinal cord of aged rats. These results are in line with research showing increased ROS generation in the spinal cord with advancing age (4). However, our study is the first to demonstrate that the increase is associated with high SAG and H₂O₂. Since high levels of ROS exceed the adaptive tolerance of cells, resulting in significant oxidative damage, apoptosis, and necrosis (3), it is possible that the observed increase in SAG and H₂O₂ may be related to the changes found in gait and balance with advancing age. The spinal cord is a vital connector and integrator, carrying and manipulating efferent motor and afferent sensory information between the brain and the periphery to control a multitude of physiological processes, including locomotion and balance (30). Since elevated levels of SAG and H₂O₂ were found

in the spinal cord of the same rats that exhibited poor performance in the balance beam test and changes in the gait parameters, a relationship between these results cannot be discarded. However, it is impossible to address direct or indirect relationships between ROS and behavioral responses. Cell failure can be caused by ROS through interference with signaling pathways and their associated components, in addition to imposing direct damage, thus incorporating both the beneficial and malign nature of ROS (3). Thus, a relationship between SAG and H_2O_2 and deficits in behavioral responses of aged rats is possible, although further studies are necessary to better understand this relationship.

Interestingly, SAG and H_2O_2 levels were similar in the spinal cord of 24- and 30-month-old rats. This similarity may be related to age-induced functional changes. Previous research showed elevated H_2O_2 production in brain mitochondria of 24-month-old rats (32). According to these authors, the content of mitochondrial cytochrome c (terminal enzyme complex of the inner mitochondria membrane electron transport chain that catalyzes electron transfer from reduced cytochrome c to molecular oxygen) remains constant in 24-month-old rats, although its functions are impaired. In this context, it can be suggested that the lack of significant changes in SAG and H_2O_2 may be related to maintenance of enzymatic activity parallel to its functional deficit in 30-month-old rats. However, it is also necessary to consider that elevated SAG and H_2O_2 may be associated with age-related neurochemical changes. Pronounced alterations in neurotransmitter markers have been demonstrated in aged nervous tissue, with the spinal cord being more severely affected than most cerebral regions in 30-month-old rats (33). Free radicals are generated in cells under oxidative stress and when signaling pathways are activated (5).

Total thiol content gradually decreased in the spinal cord with advancing age, with the greatest decrease being in old rats. This result is similar to that found in 24–26-month-old Wistar rats (7). Thus, our results reinforce that thiol content decreases with age. In addition, the present study adds new evidence since it revealed a decrease in total thiol content for ages of 18 and 30 months, which was particularly dramatic for the latter. Decreased total thiol content may be indicative of reduced efficiency of S-thiolation as a mechanism of antioxidant defense during aging, thus creating an increased risk of irreversible oxidation of -SH groups of proteins (7). In this context, our results indicate that the irreversible oxidation of -SH groups of proteins occurs during aging, but is increased in the spinal cord of old rats. Protein oxidation modifies several amino acids and protein aggregation and fragmentation (7). Thus, it can be suggested that these changes are particularly elevated in the spinal cord of old rats.

The decrease in total thiol content may be related to H_2O_2 . Thiol oxidation occurs by a two-electron mechanism, most commonly involving H_2O_2 (5). According to that

author, superoxide reacts with thiol but, at least for small molecules, the rate is slow and the reaction is not a direct electron transfer, but instead generates the thiyl radical, which regenerates superoxide and forms disulfide as the major product. This is a chain reaction but the chain is short, probably because superoxide reacts with intermediate radicals, and thiols are unlikely to compete with SOD (5). In fact, SOD activity was found to increase in the spinal cord with advancing age. Superoxide dismutase is the enzyme that converts superoxide radicals into H_2O_2 (3).

Despite a decrease in total thiol content, TAC increased in the spinal cords of 6-, 18-, 24-, and 30-month-old rats. This result may be related to changes in other antioxidant systems. TAC represents both the enzymatic and non-enzymatic antioxidant compounds in the body, such as SOD, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione (34). In fact, SOD activity increased in old rats. The inter-related changes in pro-oxidant and antioxidant defenses may be related to the lack of significant changes in lipid hydroperoxide levels with advancing age.

The present study also demonstrated the effects of regular low-intensity exercise on metabolic, behavioral, and oxidative parameters during aging. Exercise did not induce significant changes in body weight, blood glucose, and triglycerides. These results are in line with previous research (35). Interestingly, low-intensity exercise did not reduce total cholesterol. This exercise program also did not prevent age-induced decrease in soleus muscle weight/body weight ratio. It has been demonstrated that rats experience reduced total cholesterol after 12 weeks of low-intensity exercise (36). Moderate-intensity continuous training had a protective effect on relative soleus weight in 18-month-old female Sprague Dawley rats (35). Since frequency and/or intensity of exercise differed between the studies, these factors may be related to the lack of changes in total cholesterol and soleus muscle weight/body weight ratio, as shown for high- and moderate-intensity exercise (37). However, further studies are necessary to clarify this hypothesis.

While low-intensity exercise did not change gait parameters, it ameliorated performance in the balance beam test. This test assesses simple (static) equilibrium (38). Walking requires complex motor unit re-innervation coordinated by cortically integrated sensory feedback (39). Thus, our results suggested that regular low-intensity exercise improved static equilibrium, but not complex motor coordination. Since locomotor features depend on postural status at each step, with and without perturbations (40), the improvement in static equilibrium should be contributing to prevent changes in gait. However, this appears to be insufficient to change SFI. It is probable that greater training duration and/or volume are necessary to change gait parameters.

Training duration and volume may also be responsible for the lack of significant changes in spinal cord oxidative biomarkers after low-intensity exercise. Recent research

revealed that prolonged mild treadmill exercise (50% of maximal exercise capacity, 5 days/week, 40 min/day, during 10 weeks) significantly decreased H₂O₂ levels in the spinal cord of aged Lewis rats (9). However, it must be taken into account that our study had a small number of rats per group. This imposes a strong limitation to the study, which weakened comparisons between groups and could result in false-negative findings. The statistical comparison in our study was always borderline. Thus, we are uncertain whether low-intensity exercise induced, or not, changes in gait and spinal cord oxidative biomarkers in aged rats, which is in need of further evaluation. In particular, it is necessary to increase the number of rats per group. It is also necessary to compare the effects of high- and low-intensity exercise on gait and spinal cord oxidative parameters to establish the intensity of exercise needed to prevent age-induced changes in these parameters. Thus, we cannot rule out a beneficial effect of

low-intensity exercise on gait and spinal cord oxidative biomarkers.

In conclusion, the rats of the present study experienced changes in gait, balance, and spinal cord oxidative biomarkers during aging. Regular low-intensity exercise significantly improved performance in the balance beam test. Since the present study possessed limitations (small number of rats per group), a beneficial effect of low-intensity exercise on gait and spinal cord oxidative biomarkers cannot be ruled out.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Hamezah HS, Durani LW, Ibrahim NF, Yanagisawa D, Kato T, Shiino A, et al. Volumetric changes in the aging rat brain and its impact on cognitive and locomotor functions. *Exp Gerontol* 2017; 99: 69–79, doi: 10.1016/j.exger.2017.09.008.
- Viña J, Borras C, Abdelaziz KM, Garcia-Valles R, Gomez-Cabrera MC. The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19: 779–787, doi: 10.1089/ars.2012.5111.
- Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 956792, doi: 10.1155/2013/956792.
- Yonutas HM, Pandya JD, Sullivan PG. Changes in mitochondrial bioenergetics in the brain versus spinal cord become more apparent with age. *J Bioenerg Biomembr* 2015; 47: 149–154, doi: 10.1007/s10863-014-9593-5.
- Winterbourn CC. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radic Biol Med* 2015; 80: 164–170, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.017.
- Ahn JH, Choi JH, Song JM, Lee CH, Yoo KY, Hwang IK, et al. Increase in Trx2/Prx3 redox system immunoreactivity in the spinal cord and hippocampus of aged dogs. *Exp Gerontol* 2011; 46: 946–952, doi: 10.1016/j.exger.2011.08.004.
- Balu M, Sangeetha P, Murali G, Panneerselvam C. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. *Int J Devl Neurosci* 2005; 23: 501–507, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2005.06.001.
- de Souza RF, de Moraes SRA, Lopes Augusto R, de Freitas Zanona A, Matos D, Aidar FJ, et al. Endurance training on rodent brain antioxidant capacity: A meta-analysis. *Neurosci Res* 2018; pii: S0168-0102, doi: 10.1016/j.neures.2018.09.002.
- Melo KP, Silva CM, Almeida MF, Chaves RS, Marcourakis T, Cardoso SM, et al. Mild exercise differently affects proteostasis and oxidative stress on motor areas during neurodegeneration: a comparative study of three treadmill running protocols. *Neurotox Res* 2019; 35: 410–420, doi: 10.1007/s12640-018-9966-3.
- Chang HC, Lu CS, Chiou WD, Chen CC, Weng YH, Chang YJ. An 8-week low-intensity progressive cycling training improves motor functions in patients with early-stage Parkinson's disease. *J Clin Neurol* 2018; 14: 225–233, doi: 10.3988/jcn.2018.14.2.225.
- Sim YJ, Kim H, Kim JY, Yoon SJ, Kim SS, Chang HK, et al. Long-term treadmill exercise overcomes ischemia-induced apoptotic neuronal cell death in gerbils. *Physiol Behav* 2005; 84: 733–738, doi: 10.1016/j.physbeh.2005.02.019.
- Pietrelli A, Lopez-Costa J, Goni R, Brusco A, Basso N. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged old rats. *Neuroscience* 2012; 202: 252–266, doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.11.054.
- Altun M, Bergman E, Edström E, Johnson H, Ulfhake B. Behavioral impairments of the aging rat. *Physiol Behav* 2007; 92: 911–923, doi: 10.1016/j.physbeh.2007.06.017.
- Parkinson GM, Dayas CV, Smith DW. Perturbed cholesterol homeostasis in aging spinal cord. *Neurobiol Aging* 2016; 45: 123–135, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.05.017.
- Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig* 2012; 25: 49–51, doi: 10.1590/S0102-67202012000100011.
- Bloom CM, Anch AM, Dyche JS. Behavioral effects of chronic melatonin and pregnenolone injections in a myelin mutant rat (taiep). *J Gen Psychol* 2002; 129: 226–237, doi: 10.1080/00221300209602097.
- de Medinaceli L, Freed WJ, Wyatt RJ. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol* 1982; 77: 634–643, doi: 10.1016/0014-4886(82)90234-5.
- Prasad SN, Muralidhara. Protective effects of geraniol (a monoterpene) in a diabetic neuropathy rat model:

- attenuation of behavioral impairments and biochemical perturbations. *J Neurosci Res* 2014; 92: 1205–1216, doi: 10.1002/jnr.23393.
19. Tung VW, Burton TJ, Dababneh E, Quail SL, Camp AJ. Behavioral assessment of the aging mouse vestibular system. *J Vis Exp* 2014; 89: e51605, doi: 10.3791/51605.
 20. Parthasarathy V, Frazier DT, Bettcher BM, Jastrzab L, Chao L, Reed B, et al. Triglycerides are negatively correlated with cognitive function in non-demented aging adults. *Neuropsychology* 2017; 31: 682–688, doi: 10.1037/neu0000335.
 21. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; 302: 141–145, doi: 10.1016/S0304-3940(01)01636-6.
 22. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37: 277–285, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.11.015.
 23. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170–3175.
 24. Wang HD, Pagano PJ, Du Y, Cayatte AJ, Quinn MT, Brecher P, et al. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. *Circ Res* 1998; 82: 810–818, doi: 10.1161/01.RES.82.7.810.
 25. Pick E, Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J Immunol Methods* 1980; 38: 161–170, doi: 10.1016/0022-1759(80)90340-3.
 26. Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe+2 in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991; 26: 853–856, doi: 10.1007/BF02536169.
 27. Ghezzi A, Cambri L, Botezelli J, Ribeiro C, Dalia R, de Mello MA. Metabolic syndrome markers in Wistar rats of different ages. *DiabetolMetabSyndr* 2012; 4: 16, doi: 10.1186/1758-5996-4-16.
 28. Boudet J, Rouillet JB, Lacour B. Influence of fast, body weight and diet on serum cholesterol, triglycerides, and phospholipids concentrations in the aging rat. *HormMetab Res* 1988; 20: 734–737, doi: 10.1055/s-2007-1010934.
 29. von Leden RE, Khayrullina G, Moritz KE, Byrnes KR. Age exacerbates microglial activation, oxidative stress, inflammatory and NOX2 gene expression, and delays functional recovery in a middle-aged rodent model of spinal cord injury. *J Neuroinflammation* 2017; 14: 161, doi: 10.1186/s12974-017-0933-3.
 30. Musienko P, Courtine G, Tibbs JE, Kilimnik V, Savochin A, Garfinkel A, et al. Somatosensory control of balance during locomotion in decerebrated cat. *J Neurophysiol* 2012; 107: 2072–2082, doi: 10.1152/jn.00730.2011.
 31. Krause Neto W, Silva WA, Ciena AP, Souza RR, Anaruma CA, Gama EF. Aging induces changes in the somatic nerve and postsynaptic component without any alterations in skeletal muscles morphology and capacity to carry load of Wistar rats. *Front Neurosci* 2017; 11: 688, doi: 10.3389/fnins.2017.00688.
 32. Petrosillo G, Benedictis V, Ruggiero FM, Paradies G. Decline in cytochrome c oxidase activity in rat-brain mitochondria with aging. Role of peroxidized cardiolipin and beneficial effect of melatonin. *J Bioenerg Biomembr* 2013; 45: 431–440, doi: 10.1007/s10863-013-9505-0.
 33. Virgili M, Monti B, Polazzi E, Angiolini G, Contestabile A. Topography of neurochemical alterations in the CNS of aged rats. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19: 109–116, doi: 10.1016/S0736-5748(00)00057-5.
 34. Şahin A, Erten S, Altunoğlu A, Işıkoğlu S, Neşelloğlu S, Ergin M, et al. Comparison of serum oxidant and antioxidant parameters in familial Mediterranean fever patients with attack free period. *Acta Reumatol Port* 2014; 39: 316–321.
 35. Li FH, Sun L, Zhu M, Li T, Gao HE, Wu AS, et al. Beneficial alterations in body composition, physical performance, oxidative stress, inflammatory markers, and adipocytokines induced by long-term high-intensity interval training in an aged rat model. *Exp Gerontol* 2018; 113: 150–162, doi: 10.1016/j.exger.2018.10.006.
 36. Batacan Jr RB, Duncan MJ, Dalbo VJ, Connolly KJ, Fenning AS. Light-intensity and high-intensity interval training improve cardiometabolic health in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 2016; 41: 945–952, doi: 10.1139/apnm-2016-0037.
 37. Mann S, Beedie C, Jimenez A. Differential effects of aerobic exercise, resistance training and combined exercise modalities on cholesterol and the lipid profile: review, synthesis and recommendations. *Sports Med* 2014; 44: 211–221, doi: 10.1007/s40279-013-0110-5.
 38. Rond-Reig L, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J, Caston J. Role of the inferior olivary complex in motor skills and motor learning in the adult rat. *Neuroscience* 1997; 77: 955–963, doi: 10.1016/S0306-4522(96)00518-0.
 39. Feng X, Yuan W. Dexamethasone enhanced functional recovery after sciatic nerve crush injury in rats. *Bio Med Res Int* 2015; 2015: 627923, doi: 10.1155/2015/627923.
 40. Garcia-Mesa Y, Colie S, Corpas R, Cristofol R, Comellas F, Nebreda AR, et al. Oxidative stress is a central target for physical exercise neuroprotection against pathological brain aging. *J Gerontol A Bio I Sci Med Sci* 2016; 71: 40–49, doi: 10.1093/gerona/glv005.

5.2 ARTIGO 2

Este artigo mostra o efeito do envelhecimento e do exercício físico de baixa intensidade sobre a atividade de biomarcadores de estresse oxidativo em regiões cerebrais, como tronco encefálico, cerebelo e córtex cerebral, em ratos Wistar machos com idades variadas. Além disso, o artigo mostra o efeito do envelhecimento e do exercício físico sobre algumas medidas radiográficas do fêmur.

Este manuscrito está em análise na revista *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. O comprovante da submissão é mostrado como ANEXO II.

Brazilian Journal

of medical and biological research

Aging and low-intensity exercise changes oxidative biomarkers in brain regions and radiographic measures of femur of Wistar rats

Journal:	<i>Brazilian Journal of Medical and Biological Research</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silveira, Elza; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Fisiologia Santos, Maria do Carmo; Universidade Federal do Rio Grande do Sul da Silva, Thaisla; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Fisiologia Silva, Francielle ; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciencias Basicas da Saude Machado, Clivia; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da Saúde Elias, Lais; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciências Básicas da Saúde Kolberg, Angela; Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto de Ciencias Basicas da Saude Kroth, Adarly; Universidade do Oeste de Santa Catarina Partata, Wania; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Fisiologia
Keywords:	Total thiol content, Lipid hydroperoxide levels, Total antioxidant capacity, Superoxide dismutase activity, Treadmill exercise
Special Sections:	Biomedical Sciences/Physiology and Biophysics

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Aging and low-intensity exercise changes oxidative biomarkers in brain regions and radiographic measures of femur of Wistar rats

E.M.S. Silveira (<https://orcid.org/0000-0002-0238-9414>)¹, M.C.Q. Santos (<https://orcid.org/0000-0002-1663-4986>)¹, T.C.B. da Silva (<https://orcid.org/0000-0002-4432-2779>)¹, F.B.O. Silva¹, C.V. Machado (<https://orcid.org/0000-0002-8733-6230>)¹; L. Elias², A. Kolberg (<https://orcid.org/0000-0001-7897-572X>)¹, A. Kroth³ (<https://orcid.org/0000-0002-4079-9684>)³, W.A. Partata (<https://orcid.org/0000-0002-4831-1938>)¹

¹Laboratório de Neurobiologia Comparada, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

²Graduada em Medicina Veterinária.

³Área Ciências da Vida, Universidade do Oeste de Santa Catarina, Joaçaba, SC, Brazil.

Running Title: Aging and exercise changes oxidative status in brain regions.

Correspondence: Elza Maria S. Silveira

Departamento de Fisiologia

Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS

Rua Sarmiento Leite, 500, 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: +55 51 3308 3305; fax: +55 51 3308 3166

E-mail: elzamss@yahoo.com.br

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

We investigated changes in oxidative biomarkers in brain regions such as brainstem, cerebellum, and cerebral cortex of 3-, 6-, 18-, 24-, and 30-month-old rats. We also assessed the effects of low-intensity exercise on these biomarkers in these regions of 6-, 18-, and 24-month-old rats that started exercise on treadmill at 3, 15 and 21 months of age, respectively. Radiograph images of the femur were taken for all rats. Brainstem and cerebellum increased lipid hydroperoxide levels at 30 months. Total thiol content reduced in all brain regions at 24 and 30 months. Brainstem increased total antioxidant capacity (TAC) at 24 and 30 months. No change occurred in superoxide dismutase (SOD) activity. Femur increased its length and width and cortical thickness. No change occurred in medullary width. Radiolucency increased and sclerosis was found in cortical and medullary with advancing age. While exercise increased lipid hydroperoxides at 6 and 18 months, it reduced this parameter at 24 months in brainstem. Exercise reduced total thiol content in brainstem at 6 months, but no change occurred in other regions. TAC reduced only in cerebral cortex at 24 months. Exercise decreased SOD activity in cerebellum at 6 and 18 months, but this activity increased in cerebral cortex at 18 months. Exercise reduced radiolucency and medullary sclerosis. So, aging differentially changes oxidative biomarkers in different brain regions and radiographic measures of the femur. Despite the limitation of the study (number of rats/group= 5 or 6), low-intensity exercise appears to play a beneficial role in these changes.

Keywords: Total thiol content; Lipid hydroperoxide levels; Total antioxidant capacity; Superoxide dismutase activity; treadmill

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

The world population is progressively getting older. The number of older people aged 60 or over will grow from 962 million to nearly 2.1 billion by 2050 (1,2). In Brazil, it is estimated that there will be 64 million seniors by 2050 (2). Given the increasingly number of older adults worldwide, understanding aging-induced changes is imperative to promote healthy aging.

Studies have demonstrated that aging is a complex event characterized by a gradual decline of physiological functions and increased susceptibility to disease (3). The brain is a target of the aging process like other cell systems of the body (4). Evidence has shown that oxidative stress is one of the most important factors contributing to biochemical impairments of the brain during aging (3). Oxidative stress may be defined as an excessive amount of reactive oxygen species (ROS), which is the net result of an imbalance between production and destruction of these species (5). ROS include singlet oxygen, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and hydrogen peroxide (5). However, numerous endogenous antioxidant systems are in place to ensure that ROS are properly reduced. Among diverse antioxidant systems is superoxide dismutase (SOD), the enzyme that converts the superoxide anion to H_2O_2 , and thiols (5). The thiol moiety is particularly sensitive to redox reactions and is an established redox sensor that interacts with a variety of oxidants to form in many cases a reversible covalent modification that includes disulfide bond formation, a major mechanism by which protein function can be controlled (6).

The vulnerability to the oxidative stress-associated aging process appears to differ in different brain regions (7). Mitochondria isolated from aged rat cortex and hippocampus showed increased ROS production compared to young rats, which was

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

not observed in mitochondria isolated from the cerebellum (8). Aging also decreased glutathione/oxidized glutathione ratio and increased lipid peroxidation levels and superoxide dismutase activity in cerebral cortex of 24-month-old Wistar rats compared to 3-month-old rats (9). Also, aging increased lipid peroxides and lipid hydroperoxides but decreased SOD activity in the cerebrum, cerebellum and brainstem of 6-, 13-, 19- and 26-month-old male albino rats compared to 3-month-old rats (10). However, the research did not assess total thiol content. In mice, a significant increasing pattern of glutathione content was found in the cerebellum and brainstem with age (11). Thus, it is interesting to assess the changes in age-induced total thiol content in different regions of the Wistar rat brain, a common experimental model in studies of aging. Since Wistar rats' median survival age is 29-30 months (12,13) and only few of the neurochemical changes present at age of 30 months were present in a group of rats of intermediate age (14), it appears interesting to determine the changes in oxidative parameters in 30-month-old rats.

One strategy that has beneficial effects on aging-induced changes is regular physical activity (3,15). Exercise appears to protect the brain from the oxidant action (16). Nevertheless, the effect appears related to training duration and intensity (15, 16). Recent research showed that low-intensity exercise ameliorated performance of aged rats in the beam balance test, a test that assesses simple (static) equilibrium (17). However, the effects of low-intensity exercise on changes in oxidative stress biomarkers in different regions of the brain remain unknown, especially in regions with important roles in motor control.

In order to gain insight into these issues, the aim of the present study was to investigate the effects of age and low-intensity exercise on oxidative biomarkers in cerebral cortex, cerebellum and brainstem, brain regions that have important roles in

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

motor control and equilibrium. Because changes in the nervous system may compromise areas of extreme importance for the mobility of individuals – for example, the musculoskeletal system that includes bones and a network of tendons, ligaments, cartilage and attached muscles (3), we also took X-ray images of the femur to investigate aging- and exercise-induced changes in this bone.

Material and Methods

Experimental animals

All procedures involving animals were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA-UFRGS #29386). All efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used. To characterize the effect of aging on brain biomarkers, 47 intact 3-month-old male Wistar rats were obtained from a colony maintained by Universidade Federal do Rio Grande do Sul. In the laboratory, the rats were housed in groups of three per conventional cage, maintained at $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, exposed to a 12-h light/12-h dark photoperiod and provided free access to food and water, as previously described by Silveira et al. (17). Briefly, six (n=6) of the rats were acclimated for one week and killed by decapitation. The other rat groups were maintained under laboratory conditions until the ages of 6 (n=12), 18 (n=12), 24 (n=12) and 30 (n=5) months. All rats were kept under close observation and regularly weighed, including prior to sacrifice. Since some rats died of natural causes, the final number of experimental animals was 12 for 6-months, ten for 18- and 24-months, and three for 30-months.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The animals were classified as young adult (3 months), adult (6 months), middle-aged (18 months), young elderly (24 months), and old (30 months) (17). These ages were chosen because ages of 6, 18, 24, and 30 months correspond to human ages of 18, 45, 60, and 75 years, respectively (17,18).

Exercise protocol

To characterize the effect of regular low-intensity exercise on brain oxidative biomarkers, rats were randomly selected for an exercise program at ages of 3-, 15-, and 21-months. The exercise program was made for 12 weeks (Silveira et al. 2019). Thus, rats at ages 3, 15 and 21 months exercised until ages of 6, 18 and 24 months, respectively. Since there were only three 30-month-old rats at 27 months, use of these rats in the exercise program was limited. Non-exercised rats remained sedentary.

Prior to initiating the exercise program, the exercise groups were familiarized with a treadmill for one week, 3 times/week, 30 min/day. Having successfully performed the exercise protocol the rats began the exercise program, which consisted of running on a treadmill designed for human use (Runner, Brazil), but modified for use by rats, for 30 minutes/day, 3 times/week, for 12 weeks. Each session included a warm-up period of 5 minutes at 2m/min, then exercise for 5 minutes at 5m/min and 20 minutes at 8m/min, while the incline was maintained at 0% (17).

The exercise was performed only three times a week to avoid chronic stress, inflammation or muscle damage, and to allow the liver and muscle to recover glycogen; rats received no stimulation (aversive or appetitive) to motivate them to run (19). All rats were sacrificed at the same time of day (beginning at 8:00 am), without fasting.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Sample preparation

Rats were sacrificed by decapitation and whole brain and right femur was promptly collected. The femur was carefully released of soft tissue (muscles, ligaments, tendons, nerves, vessels), cooled, and used for X-ray analysis. All cerebral cortex, cerebellum and brainstem were excised carefully on ice. These tissues were homogenized in 1.15% KCl diluted 1:5 (w/v) containing 1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, and centrifuged at 1000 *g* for 20 min at 4 °C. The supernatant was used for assays of total antioxidant capacity (TAC), total thiols content, superoxide dismutase (SOD) activity, and lipid hydroperoxides levels.

Determination of lipid hydroperoxides levels

The lipid hydroperoxides were measured by oxidation of Fe²⁺ by LOOH in an acid medium containing xylenol orange dye, which forms a complex with Fe³⁺, as described by Jiang et al. (20). Results are reported as μmol/g tissue.

Determination of TAC

The TAC was determined with 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation, which, in an acid medium, is decolorized by antioxidants, according to their concentration and antioxidant capacity (21). Results are reported in μmol·eq trolox⁻¹·g tissue⁻¹.

Determination of total thiol levels

Total thiol content was determined as described by Aksenov and Markesbery (22). Briefly, 30 μL of a tissue sample was mixed with 1 mL of phosphate/EDTA buffer, pH 7.5, and 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoic) acid (DTNB, 10 mM). Control samples, which

1
2
3
4 did not include DTNB, were run simultaneously. The absorbance was read at 412 nm
5
6 after 30 min of incubation at room temperature, and the results are reported as
7
8 mmol/mg tissue.
9

10 11 12 13 **Determination of SOD activity**

14
15 SOD activity was measured based on its action to neutralize superoxide radicals
16
17 to prevent oxidation of adrenalin to adrenochrome, a colored byproduct that can be
18
19 measured at 480 nm. The reaction medium contained glycine buffer (50 mM, pH 11.3)
20
21 and adrenalin (60 mM, pH 2.0), and the results are reported as units/mg protein (23).
22
23
24
25
26

27 **X-ray analysis of the femur**

28
29 To X-ray analysis, the rat femur specimens were positioned along its long axis.
30
31 Dorsal-ventral and medial-lateral view X-rays were collected using an X-ray unit
32
33 (IRay Technology, Model Mars 1417.PSI, 100 mA, 45 kV, 0.01s, Shanghai, China).
34
35 The radiographs were evaluated using I-Ray Vet software (I-Ray Technology,
36
37 Shanghai, China). The following parameters were used for the evaluation of the
38
39 radiograph images: femur length and width, thickness of cortical bone in its medial
40
41 and lateral regions, total cortical thickness (medial plus lateral thickness), and
42
43 medullary width (Figure 1). It was also analyzed radiolucency, radiopacity,
44
45 remodeling of femoral neck, the presence of sclerosis in cortical and/or medullar,
46
47 bone deformity, fracture, and presence of osteophyte.
48
49
50
51

52
53 Measurements were always taken from femoral head to femoral condyles. The
54
55 measures of cortical, medullary, and width were always taken in the diaphysis, in
56
57 mid-portion of the femur. Radiographs were evaluated by a veterinary with training
58
59
60

1
2
3
4 and experience in veterinary radiology. The veterinary was blinded to experimental
5
6 groups that she was assessing.
7
8
9

10 11 **Statistical analysis**

12
13 The sample size for the present study was based on previous studies using Win
14
15 Pepi software version 9.1, a significance level of 0.05 and 95% power, which resulted
16
17 in a sample size of eight rats per group, as described in Silveira et al. (17). However,
18
19 some rats died during aging, so the final sample size was 5 or 6 rats per group,
20
21 except for 30-month-old rats which had a sample size of 3 rats. Data from sedentary
22
23 rats were compared between different ages to show the effect of aging. Data from
24
25 exercise rats were compared to sedentary rats to show the effect of regular low-
26
27 intensity exercise in rats with different ages. Statistical analyses were performed
28
29 using SigmaPlot version 11.0 (Systat Software Inc., Chicago, IL) for Windows.
30
31 Normal Gaussian distribution of the data was analyzed by Shapiro-Wilk test, while
32
33 Levene's test was used to analyze homogeneity of variance. Data of aging were
34
35 analyzed using one-way ANOVA, while the effect of exercise was analyzed using
36
37 two-way ANOVA. The Tukey test was used as *post hoc* test. Differences were
38
39 considered statistically significant when P was <0.05. All data are reported as
40
41 mean±SE of the mean.
42
43
44
45
46
47
48
49

50 **Results**

51
52
53 Lipid hydroperoxide levels were similar in the brainstem of 3-, 6- and 18-month-old
54
55 rats (Figure 2A). Despite insignificant, lipid hydroperoxide levels were 32% higher in
56
57 this region of 24-month-old rats. This parameter was 63% higher in the brainstem of
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

30-month-old rats compared to 3-, 6- and 18-month-old rats, but 23% compared to 24-month-old rats. In cerebellum, no significant difference was found between 3-, 6-, 18- and 24-month-old rats for lipid hydroperoxides levels. However, such levels were 64% higher in the cerebellum of 30-month-old rats compared to 3- and 6-month-old rats (Figure 2B), but 14% compared to 18- and 24-month-old rats. No significant differences were found between 3-, 6-, 18-, 24- and 30-month-old rats for lipid hydroperoxides in cerebral cortex (Figure 2C). Regular low-intensity exercise significantly increased lipid hydroperoxides in brainstem of 6- and 18-month-old rats compared to same-age sedentary rats (Figure 2D). The increase was 60% at 6 months, but 51% at 18 months. However, low-intensity exercise decreased (28%) lipid hydroperoxides in brainstem of 24-month-old rats compared to same-age sedentary rats. Exercise did not induce significant changes in lipid hydroperoxides of cerebellum and cerebral cortex (Figure 2E,F).

No significant difference was found in TAC of the brainstem of 3-, 6- and 18-month-old rats (Figure 3A). However, TAC at 24 months was significantly higher (25%) than at 3 and 6 months. TAC was 15% higher in brainstem of 30-month-old rats compared to 24 months, but 44% higher compared to 3 and 6 months. No significant differences were found between 3-, 6-, 18-, 24- and 30-month-old rats for TAC of cerebellum (Figure 3B) and cerebral cortex (Figure 3C). Regular low-intensity exercise did not significantly change TAC in the brainstem and cerebellum of 6-, 18- and 24-month-old rats (Figure 3D,E). However, exercise decreased (17%) significantly the TAC in cerebral cortex of 24-month-old rats compared to same-age sedentary rats (Figure 3F).

Total thiol content of the brainstem was similar for 3- and 6-month-old rats. However, it was lower (approximately 31%) in the brainstem of 18-, 24- and 30-

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

month-old rats compared to 3- and 6-month-old rats (Figure 4A). Total thiol content of the cerebellum was lower for older ages (Figure 4B), being 45% lower compared to 3-, 6- and 18-month-old rats. Total thiol content of the cerebral cortex was also lower for older ages (Figure 4C). This capacity was approximately 30% lower at 24 and 30 months compared to 18 months, and around 62% lower compared to 3 and 6 months. Regular low-intensity exercise decreased (58%) total thiol content in brainstem of 6-month-old rats compared to same-age sedentary rats. Interestingly, regular low-intensity exercise did not significantly change total thiol content in the brainstem of 18- and 24-month-old rats (Figure 4D). The exercise program did not induce significant changes in total thiol content of the cerebellum and cerebral cortex compared to same-age sedentary rats (Figure 4E,F).

Superoxide dismutase activity did not differ significantly in the brainstem, cerebellum and cerebral cortex of 3-, 6-, 18-, 24- and 30-month-old rats (Figure 5A-C). While low-intensity exercise did not significantly change SOD activity in brainstem, it significantly decreased SOD activity in cerebellum of 6- and 18-month-old rats compared to same-age sedentary rats of (Figure 5E). Such decrease was not found at 24 months. In cerebral cortex, SOD activity significantly increased only at 18 months (Figure 5F).

The femur length was significantly greater (approximately 15%) for 6-, 18-, 24- and 30-month-old rats compared to 3-month-old rats (Figure 6A). It was also significantly greater (6%) for 24-month-old rats compared to 6-month-old rats. Interestingly, femur length was similar between 30-month-old rats and 6-month-old rats, but shorter (4%) than in 18- and 24-month-old rats. Despite insignificant, the femur width was 12% greater in 6-month-old than in 3 month-old rats. This measure was significantly greater (approximately 33%) in 18-, 24- and 30-month-old rats than in 3-month-old

1
2
3
4 rats (Figure 6B). The femur width was significantly greater in 24-month-old rats than
5
6 in 6- and 18-month-old rats, being 25% and 9% greater at 24 months than at 6 and
7
8 18 months, respectively. Nevertheless, femur width was similar in 30-month-old rats
9
10 and 18-month-old rats, but smaller (9%) than in 24-month-old rats. None of the
11
12 parameters exhibited significant changes after low-intensity exercise (Figure 6C,D).
13

14
15 Thickness of cortical bone in the middle third of the femur (lateral and medial)
16
17 differed between ages. In the medial region, thickness was approximately 100%
18
19 greater at 6, 18, 24 and 30 months than at 3 months (Figure 7A). This parameter was
20
21 also significantly greater (40%) for 24-month-old rats compared to 6-month-old rats.
22
23 Thickness of cortical bone in the medial region was similar in 30-month-old rats and
24
25 18-month-old rats, but 14% smaller than in 24-month-old rats. In the lateral region,
26
27 the thickness was significantly greater (approximately 78%) at 6, 18, 24 and 30
28
29 months than at 3 months. Only 18- and 24-month-old rats had thickness of the lateral
30
31 region significantly greater (approximately 30%) compared to 6-month-old rats
32
33 (Figure 7B). The thickness of cortical bone in the lateral region was 14% smaller in
34
35 30-month-old than in 18- and 24-month-old rats. Similar results were found for total
36
37 cortical thickness (medial+lateral) (Figure 7C). There were no significant changes in
38
39 medullary width (Figure 7D). None of the parameters exhibited significant changes
40
41 after low-intensity exercise (Figure 7E-G).
42
43
44
45
46
47

48 Table 1 summarizes other radiographic data. Aging induced sclerosis in the
49
50 cortical bone and medullary cavity. In cortical bone, sclerosis was observed at 18, 24
51
52 and 30 months, being light for 18-month-old rats and moderate for 24- and 30-month-
53
54 old rats. In medullary cavity, sclerosis was observed only in 24- and 30-month-old
55
56 rats, being severe in 24-month-old rats and moderate in 30-month-old rats. Severe
57
58 radiolucency was observed in femur at 24 and 30 months. Only 30-month-old rats
59
60

1
2
3
4 showed light radiopacity. Light bone deformity was observed at 18, 24 and 30
5 months of age. This change was located predominantly in greater trochanter or
6 femoral condyles. Only one rat exhibited light deformity in lesser trochanter at 18
7 months. Remodeling of femoral neck was observed at 18 and 24 months, being
8 moderate in 18-month-old rats and severe in 24-month-old rats. Fracture was not
9 found in femur through aging. Osteophyte was found at 24 months. Regular low-
10 intensity exercise did not change the occurrence of cortical sclerosis at 24 months,
11 but it reduced this measure in medullary cavity. Exercise also reduced radiolucency
12 at 24 months. However, exercise did not induce changes in the remodeling of
13 femoral neck and bone deformity. None of the radiographic measures exhibited
14 significant change in sedentary and exercise rats at 3 and 6 months.
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

32 Discussion

33
34
35
36 The present study showed the effects of aging and low intensity exercise on
37 oxidative biomarkers in brainstem, cerebellum and cerebral cortex. The effects of
38 aging and exercise on femoral radiographic measurements were also evaluated.
39
40
41
42

43 In the brain, lipid hydroperoxides increased significantly in the brainstem and
44 cerebellum at 30 months. However, a small increase occurred at 24 months.
45 Increased lipid oxidation in distinct brain regions seems to be a common event during
46 aging. Lipid peroxide and lipid hydroperoxide values gradually increased in brainstem
47 and cerebellum of male albino rats at 6, 13, 19 and 24 months compared to 3 months
48 (10). Our results reinforce the increase in brainstem and cerebellum in older rats, and
49 further show that the increase is greater in 30-month-old rats, the maximum life span
50 of male Wistar rats (12,13). The lack of significant changes at 6, 18 and 24 months
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 may be related to mitochondrial bioenergetics. Genetic, proteomic, or environmental
5 changes have been shown to influence mitochondrial bioenergetics changes during
6 aging (24).
7
8
9

10
11 However, lipid hydroperoxides did not vary significantly in cerebral cortex, which
12 differed from the study by Gupta et al. (10). These authors reported an increase in
13 lipid hydroperoxides throughout aging. However, while these authors used cerebrum,
14 our study used only cerebral cortex. This may be the cause of the difference in
15 results. Nevertheless, lipid peroxides increased significantly in the cerebral cortex of
16 24-month-old Wistar rats compared to 3 month-olds (9), and in frontal and temporal
17 cortices of 18-month-olds compared to 10-month-olds (25). In these studies, lipid
18 peroxides were determined by a different technique than the one we used here. Also,
19 our study did not evaluate lipid hydroperoxides in specific cortical regions. These
20 might be the cause of the difference between our results and those in the literature.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 Parallel to changes in lipid hydroperoxides, the total thiols content was significantly
35 decreased in the brain regions of older rats. The drop in total thiols during aging is
36 consistent with literature data (7,9), but our study adds novelty by showing that the
37 drop is similar between 24 and 30 months. Since a reduction in total thiol content in
38 lumbosacral spinal cord was observed in older rats (17), the fall in total thiols seems
39 to be a common event in the central nervous system of aged rats. Decreased total
40 thiol content appears to be indicative of reduced efficiency of S-thiolation as
41 mechanism of antioxidant defense during aging (26). So, it may be suggested that
42 this mechanism is reduced in the central nervous system of older Wistar rats.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54
55 Despite the reduction in total thiols, TAC increased in the brainstem of old rats. A
56 previous study showed that TAC reduced in the cerebral cortex, cerebellum and
57 brainstem of 24-month-old Wistar rats compared to 3-month-olds (27). At present we
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

cannot explain this difference, but it may be suggested that the change is related to gender in the Wistar strain. Sex differences were found in nitric oxide levels and antioxidant defense systems in some regions of rat brain (28). Since TAC increased in brainstem (results of the present study) and lumbosacral spinal cord (17) of older rats, it can be thought that the alteration in TAC differs in these regions compared to the higher ones of the neuroaxis.

Interestingly, thiols appear to be the major determinant of TAC in tissue homogenate (29). However, our study found no direct relationship between changes in TAC and total thiols. According to Balcerczyk et al. (29), adaptation to oxidative stress may involve mobilization of mechanisms other than increase in thiols content. However, SOD activity did not vary significantly in brain regions during aging. This suggests that other antioxidant systems could have their activity increased over aging. However, we have not evaluated other antioxidant systems. Future research group studies will address this issue.

The lack of significant changes in SOD activity during aging has also been observed in other studies of rat brain up to 24 months (7,9), which makes data from 30-month-old rats novel. The similarity between our data and those in the literature reinforces our results. As SOD is the enzyme that converts superoxide radicals into H_2O_2 (5), the maintenance of its activity indicates that this conversion remains unchanged during aging. However, while SOD activity increased significantly in lumbosacral spinal cord of old rats (17), it did not occur in the brain regions. Thus, the spinal cord seems to exhibit changes in SOD activity that differs from that of the brain during aging. In fact, it has been demonstrated differential age- and region-specific changes in rat brain mitochondrial function (24). In addition, spinal cord

1
2
3
4 mitochondria appear to produce more ROS and cause more oxidative damage than
5
6 age-matched brain mitochondria (8).
7

8
9 Aging also caused changes in radiographic measurements of the femur. The
10
11 increase in length and width of this bone is in accordance with literature data (30). In
12
13 this study, the authors observed that the total bone mineral density of the femur
14
15 increased up to 24 months, followed by a slight decrease at 30 months, and these
16
17 changes occurred alongside changes in body weight. As it has been observed that
18
19 body weight of Wistar rats increased up to 24 months, followed by a slight fall at 30
20
21 months (17), changes in femur length and width are likely related to changes in body
22
23 weight.
24
25

26
27 The changes that occurred in the cortical bone are in agreement with literature
28
29 data where other methods were used for evaluation (30,31). The absence of
30
31 significant changes in the medullary cavity width suggests that aging did not induce
32
33 expansion in this region of the femur. It has recently been observed that the
34
35 medullary cavity did not change significantly in the femur of 10- and 16-month-old
36
37 mice (32). Thus, one may think that the lack of medullary expansion in the femur is
38
39 characteristic of rodents. As the medullary cross-sectional area was significantly
40
41 larger in older than young men, and this change seemed to indicate endosteal
42
43 resorption (33), it may be suggested that this change did not occur in the femur of old
44
45 rats. According to Iida and Fukuda (30), the cortical area decreased while the
46
47 trabecular area increased with increasing age, and it might be due to the dominance
48
49 of periosteal formation rather than endosteal resorption by the modeling pattern in
50
51 rats, indicating that the cortical thickness thins with increasing age. In fact,
52
53 radiolucency and remodeling of femoral neck increased in femur of old rats, which
54
55 may be indicating a reduction in bone mass. According to López and López (34), low
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

bone mineral density is marginally associated with a higher frequency of radiolucent periapical lesions. The presence of cortical and medullary sclerosis may be related to inflammatory processes induced by aging. According to Fenger et al. (35), medullary sclerosis may be related to inflammatory factors. In fact, the production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6, pro-inflammatory cytokines, in the bone marrow mesenchymal stromal cells was significantly higher in the aged compared to adult rats (36). Considering the radiographic data, it can be suggested that the rat femur of the present study exhibited the characteristic changes induced by aging. It is possible that the absence of osteophyte in 30-month-old rats' femur is related to the small number of animals. Future studies with a larger number of rats aged 30 months may clarify this issue.

The present study also demonstrated the effects of regular low-intensity exercise on brain oxidative parameters and radiographic measures of femur. Results showed that exercise increased lipid hydroperoxides in brainstem of young and middle-aged rats. However, it reduced this parameter in brainstem at 24 months, with no significant changes in cerebellum and cerebral cortex at any age. According to Jolitha et al. (13), the differences in lipid peroxidation in different brain regions could be ascribed to the different consumption of oxygen. A recent meta-analysis revealed that moderate physical exercise did not induce an increase in lipid peroxidation in brain regions such as cerebral cortex, brainstem, and cerebellum in 62% of the studies evaluated, but in a subset of studies (15%) increased levels of thiobarbituric acid reactive substances were found, an indicator of lipid peroxidation (16). As the differences seemed to be related to exercise intensity and/or frequency (16), this may be the cause of the differences between our results and those in the literature.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Differences in exercise intensity and/or frequency may also be the cause of divergences in antioxidant parameter results. According to de Souza et al. (16), the rodent training protocols between 20 and 30 min over a period of 8 weeks do not affect antioxidant enzymatic equilibrium, but aerobic exercise for more than 8 weeks induced increase in catalase and SOD activities. However, our study revealed a decrease in SOD activity at 6 and 18 months in the cerebellum, but an increase in this activity at 18 months in the cerebral cortex. Chalimoniuk et al. (37) observed that moderate intensity endurance training significantly enhanced the number of components of antioxidant barrier, including SOD activity, mostly in the neocortex, and to a lesser extent, in the cerebellum and striatum of adolescent Wistar rats. So, one cannot rule out the possibility that the differences between our results and those in the literature relate to the exercise program.

The difference in exercise frequency and/or intensity may also be the cause of the lack of recovery of the total thiols content in the different brain regions. In adolescent rats, endurance training for 13 weeks increased total glutathione content in cerebral cortex, cerebellum and midbrain (37). However, exercise training on a treadmill for 7.5 weeks did not significantly change the levels of glutathione in cortex, brainstem and striatum of young rats (38). Interestingly, our study showed a significant decrease in total thiols content in brainstem of exercised 6-month-old rats. This finding may relate to different mechanisms stimulated by exercise. It has been suggested that oxidative stress affects different pathways depending not only on the ROS/reactive nitrogen species quantity but also on their types, primary or secondary species (3).

Exercise also caused an improvement in radiographic measurements, since there was a decrease in radiolucency and absence of medullary sclerosis in the femur of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

exercised rats. Based on the previously presented discussion about these femur measures, the results point towards the beneficial effect of exercise on aging-induced bone loss. Exercise (treadmill run for 40 minutes/day, 3 times/week for 8 weeks) has recently been shown to work towards reversing the bone marrow aging phenotype in old male mice (39). In aging female Wistar rats, the strength training triggered physiological responses that resulted in changes in the bone microenvironment and brought benefits to biomechanical parameters of bone tissue (36). However, a recent study showed that moderate but not low intensity exercise performed 4 times/week for 4 weeks returned the number of osteoclasts back to normal, which had been altered by d-galactose-induced aging (40). Considering the findings of the present study, one cannot rule out the possibility that the small changes found in radiolucency are indicative of the beginning of a beneficial effect of low intensity exercise due to the longer duration of the exercise. Further studies are needed to clarify this issue.

We recently demonstrated that regular low intensity exercise improved balance in older rats (17). Since it was suggested that changes in the nervous system may compromise areas of extreme importance for the mobility of individuals, e.g. the musculoskeletal system (3), it is possible that exercise-induced changes in femoral radiographic measurements and oxidative parameters in brain regions are contributing to the improvement in balance of older mice. However, we must consider that our study had a small number of rats. This imposes a strong limitation to the study, which weakened comparisons between groups and could result in false-negative findings. The statistical comparison in our study was sometimes borderline. Despite this limitation, our results point towards the benefit of low-intensity exercise versus aging-induced changes in oxidative biomarkers and femur bone mass.

1
2
3
4 In conclusion, our study showed that aging modified the activity of oxidative
5 biomarkers in brain regions, and change is region-dependent and more pronounced
6 in older rats. Aging also altered radiographic measurements of the femur suggesting
7 bone loss. It has been shown for the first time that regular low-intensity exercise
8 interferes with changes induced by aging. Although the effect is complex, the data
9 point towards the beneficial effect of low-intensity exercise on changes caused by
10 advancing age. So, although the study has had limitations (small number of rats), it
11 reinforces the beneficial role of low-intensity exercise during aging.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **Acknowledgements**

26
27
28
29 This study was supported by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do
30 Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and the Conselho Nacional de
31 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Qi Y, Li R, Xu L, Yin L, Xu Y, Han X, et al. Neuroprotective effect of dioscin on the aging brain. *Molecules* 2019; 24: pii: E1247.
2. Neumann LTV, Albert SM. Aging in Brazil. *Gerontologist* 2018; 58: 611-617.
3. Kruk J, Aboul-Enein HY, Kladna A, Bowser JE. Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. *Free Radic Res* 2019; May 16:1-25.
4. Jové M, Pradasa I, Dominguez-Gonzalez M, Ferrer I, Pamplona R. Lipids and lipoxidation in human brain aging. Mitochondrial ATP-synthase as a key lipoxidation target. *Redox Biology* 2018; Dec 19:101082.
5. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 1-11.
6. Eaton P. Protein thiol oxidation in health and disease: Techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. *Free Radic Res* 2006; 40:1889-1899.
7. Moyse E, Arsenault M, Gaudreau P, FerlandG, Ramassamy C. Brain region-specific effects of long-term caloric restriction on redox balance. *Mech Ageing Dev* 2019; 179: 51–59.
8. Yonutas HM, Pandya JD, Sullivan PG. Changes in mitochondrial bioenergetics in the brain versus spinal cord become more apparent with age. *J Bioenerg Biomembr* 2015; 47: 149-154.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

9. Sousa MSB, Holanda IMS, Monteiro HMC, Amâncio-Dos-Santos A. Antioxidant extract counteracts the effects of aging on cortical spreading depression and oxidative stress in the brain. *Acta Cir. Bras.* 2018; 33: 472-482.
10. Gupta A, Hasan M, Chander R, Kapoor NK. Age-Related Elevation of lipid peroxidation products: Diminution of superoxide dismutase activity in the central nervous system of rats. *Gerontology* 1991; 37: 305-309.
11. Hussain S, Slikker WJr, Ali SF. Age-Related changes in antioxidant enzymes. superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. *Int J Dev Neurosci* 1995; 13: 811-817.
12. Altun M, Bergman E, Edström E, Johnson H, Ulfhake B. Behavioral impairments of the aging rat. *Physiol Behav* 2007; 92: 911–923.
13. Jolitha AB, Subramanyam MV, Asha Devi S. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: Studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. *Exp Gerontol* 2006; 41: 753–763.
14. Virgili M, Monti B, Polazzi E, Angiolini G, Contestabile A. Topography of neurochemical alterations in the CNS of aged rats. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19: 109–116.
15. Falck RS, Davis JC, Best JR, Crockett RA, Liu-Ambrose L. Impact of exercise training on physical and cognitive function among older adults: a systematic review and meta-analysis. *Neurobiol Aging* 2019; 79: 119-130.
16. de Souza RF, de Moraes SRA, Augusto RL, de Freitas Zanona A, Matos D, Aidar FJ, et al. Endurance training on rodent brain antioxidant capacity: a meta-analysis. *Neurosci Res* 2018; pii: S0168-0102(18)30384-5.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

17. Silveira EMS, Kroth A, Santos MCQ, Silva TCB, Silveira D, Riffel APK, et al. Age-related changes and effect of regular low-intensity exercise on gait and balance as well as oxidative biomarkers in the spinal cord of Wistar rats. *Braz J Med Biol Res* 2019; 52: e8429.
18. Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig* 2012; 25: 49–51.
19. Pietrelli A, Lopez-Costa J, Goni R, Brusco A, Basso N. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged old rats. *Neuroscience* 2012; 202: 252–266.
20. Jiang ZY, Woollard ACS, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe⁺² in the presence of xylene orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids* 1991; 26: 853–856.
21. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37: 277–285.
22. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001; 302: 141–145.
23. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 3170–3175.
24. Pandya JD, Royland JE, MacPhail RC, Sullivan PG, Kodavanti PR. Age- and brain region-specific differences in mitochondrial bioenergetics in Brown Norway rats. *Neurobiol Aging* 2016; 42: 25–34.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

25. Mizuno Y, Ohta K. Regional distributions of thiobarbituric acid-eactive products, activities of enzymes regulating the metabolism of oxygen free radicals, and some of the related enzymes in adult and aged rat brains. *J Neurochem* 1986; 46: 1344-1352.
26. Balu M, Sangeetha P, Murali G, Panneerselvam C. Age-related oxidative protein damages in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23: 501–507.
27. Braidy N, Poliak A, Grant R, Javaseena T, Mansour H, Chan-Ling T, et al. Mapping NAD⁺ metabolism in the brain of ageing Wistar rats: potential targets for influencing brain senescence. *Biogerontology* 2014; 15: 177-198.
28. Taskiran D, Kutay FZ, Sozmen E, Pogun S. Sex differences in nitrite/nitrate levels and antioxidant defense in rat brain. *Neuroreport*. 1997; 8: 881-884.
29. Balcerczyk A, Grzelak A, Janaszewska A, Jakubowski W, Koziol S, Marszalek M, et al. Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity. *Biofactors* 2003; 17: 75-82.
30. Iida H, Fukuda S. Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area and strength at different skeletal sites in male rats. *J Vet Med Sci* 2002; 64: 29-34.
31. Cunningham HC, West DWD, Baehr LM, Tarke FD, Baar K, Bodine SC, et al. Age-dependent bone loss and recovery during hindlimb unloading and subsequent reloading in rats. *BMC Musculoskelet Disord* 2018; 19: 223.
32. Blanton C. Bone response to dietary co-enrichment with powdered whole grape and probiotics. *Nutrients* 2018; 10 pii: E146.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

33. Allen MD, McMillan SJ, Klein CS, Rice CL, Marsh GD. Differential age-related changes in bone geometry between the humerus and the femur in healthy men. *Aging Dis* 2012; 3: 2; 156-163
34. López-López J, Castellanos-Cosano L, Estrugo-Devesa A, Gómez-Vaquero C, Velasco-Ortega E, Segura-Egea JJ. Radiolucent periapical lesions and bone mineral density in post-menopausal women. *Gerodontology* 2015; 32: 195-201.
35. Fenger CK, Bertone JJ, Biller D, Merryman J. Generalized medullary infarction of the long bones in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 202: 621-623.
36. Singulani MP, Stringhetta-Garcia CT, Santos LF, Morais SR, Louzada MJ, Oliveira SH, et al. Effects of strength training on osteogenic differentiation and bone strength in aging female Wistar rats. *Sci Rep* 2017; 7: 42878.
37. Chalimoniuk M, Jagsz S, Sadowska-Krepa E, Chrapusta SJ, Klapcinska B, Langfort J. Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats. *J Physiol Pharmacol* 2015, 66: 539-547.
38. Somani SM, Ravi R, Rybak LP. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 50: 635-639.
39. Baker J, Nederveen JP, Ibrahim G, Ivankovic V, Joannis S, Parise G. Exercise training differentially alters axial and appendicular marrow cellularity in old mice. *Appl Physiol Nutr Metab* 2018; 43: 523-527.
40. Partadiredja G, Karima N, Utami KP, Agustini D, Sofro ZM. The .Effects of light and moderate intensity exercise on the femoral bone and cerebellum of D-galactose-exposed rats. *Rejuvenation Res* 2019; 22: 20-30.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure Legends

Figure 1. Lateral view radiographic image of the femoral bone from Wistar rat showing parameters measured in this study.

Figure 2. Lipid hydroperoxide levels in the brainstem (A), cerebellum (B) and cerebral cortex (C) of Wistar rats of different ages (A-C) and after 12 weeks of treadmill running (D-F). Data are reported as mean±SE. *P<0.05 compared to 3- and 6-month-old rats; (°)P<0.05 compared to sedentary group of same age [one-(A-C) and two-way (D-F) ANOVA followed by Tukey *post hoc* test].

Figure 3. Total antioxidant capacity (TAC) in the brainstem (A), cerebellum (B) and cerebral cortex (C) of Wistar rats of different ages (A-C) and after 12 weeks of treadmill running (D-F). Data are reported as mean±SE. *P<0.05 compared to 3- and 6-month-old rats; #P<0.05 compared to 3-, 6-, 18- and 24-month-old rats; (°)P<0.05 compared to sedentary group of same age [one-(A-C) and two-way (D-F) ANOVA followed by Tukey *post hoc* test].

Figure 4. Total thiol content in the brainstem (A), cerebellum (B) and cerebral cortex (C) of Wistar rats of different ages (A-C) and after 12 weeks of treadmill running (D-F). Data are reported as mean±SE. *P<0.05 compared to 3- and 6-month-old rats; (#)P<0.05 compared to 3-, 6- and 18-month-old rats; (°)P<0.05 compared to sedentary group of same age; ##P<0.05 compared to 6- and 18-month-old rats; **P<0.05 compared to sedentary and exercised 6-month-old rats and sedentary 18-month-old rats [one-(A-C) and two-way (D-F) ANOVA followed by Tukey *post hoc* test].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 5. Superoxide dismutase activity (SOD) in the brainstem (A), cerebellum (B) and cerebral cortex (C) of Wistar rats of different ages (A-C) and after 12 weeks of treadmill running (D-F). Data are reported as mean±SE. (*)P<0.05 compared to sedentary group of same age [one-(A-C) and two-way (D-F) ANOVA followed by Tukey *post hoc* test]. USOD: units of SOD.

Figure 6. Femur length (A) and width (B) of Wistar rats of different ages and after 12 weeks of treadmill running (C,D). Data are reported as mean±SE. @Significant difference compared to 3-month-old rats; *P<0.05 compared to 3- and 6-month-old rats; ***P<0.05 compared to 6-month-old rats; ##P<0.05 compared to 6- and 18-month-old rats; +P<0.05 compared to 18-month-old sedentary rats [one-(A-C) and two-way (D-F) ANOVA followed by Tukey *post hoc* test].

Figure 7. Medial (A) and lateral (B) cortical thickness, total cortical thickness (C) and medullary canal width (D) of the femur of Wistar rats of different ages and after 12 weeks of treadmill running (E-G). Data are reported as mean±SE. **P<0.05 compared to 3-month-old rats; ***P<0.05 compared to 6-month-old rats; +P<0.05 compared to 18-month-old sedentary rats [one-(A-C) and two-way (D-F) ANOVA followed by Tukey *post hoc* test].

Figure 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

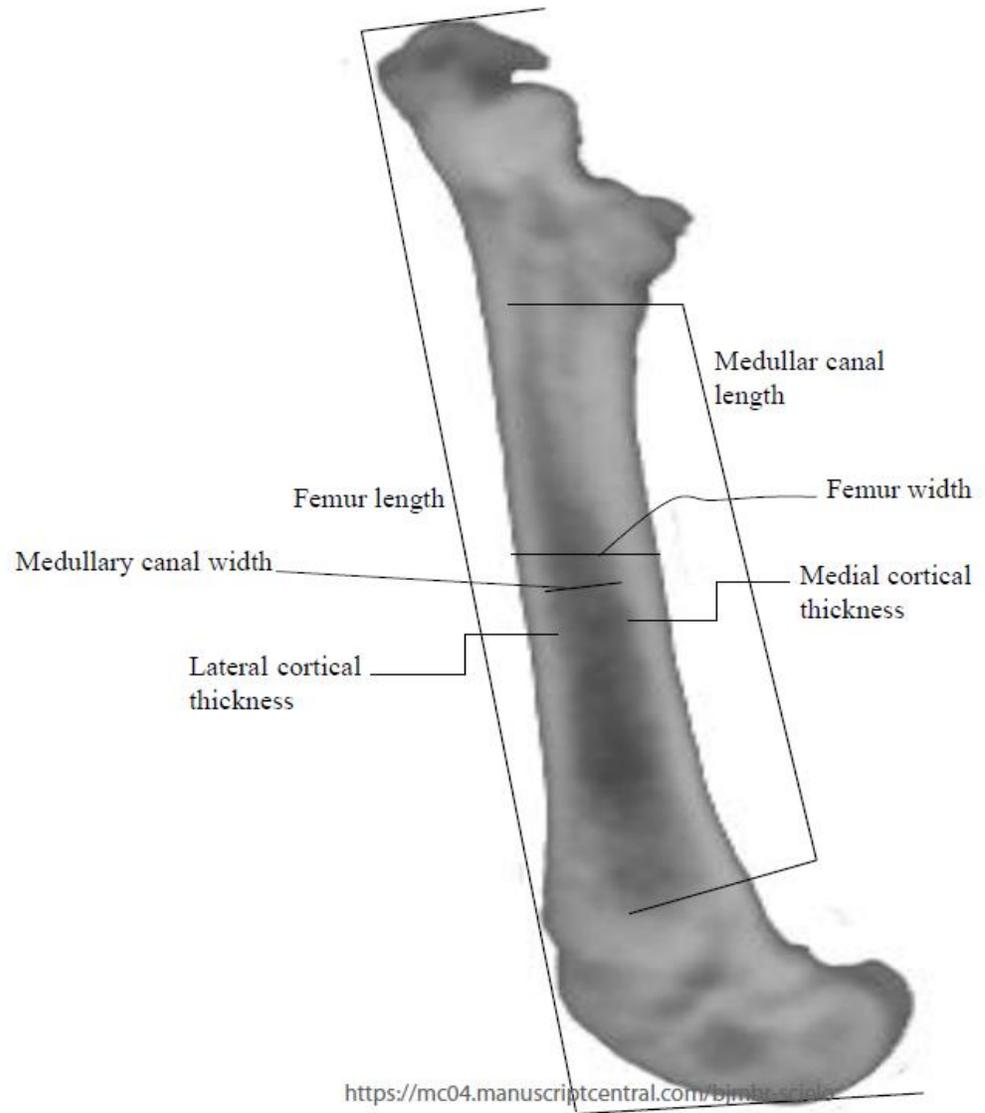
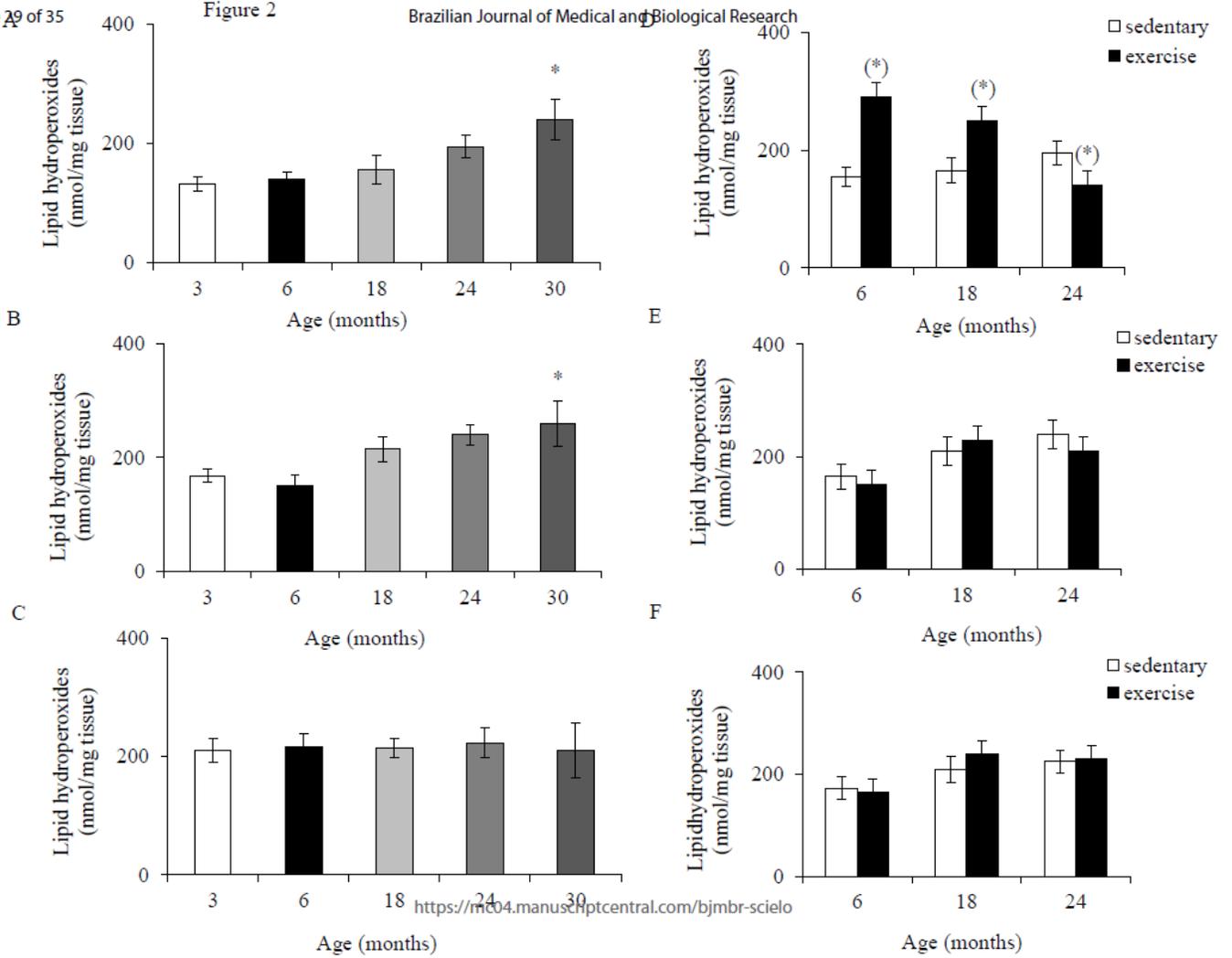


Figure 2

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41



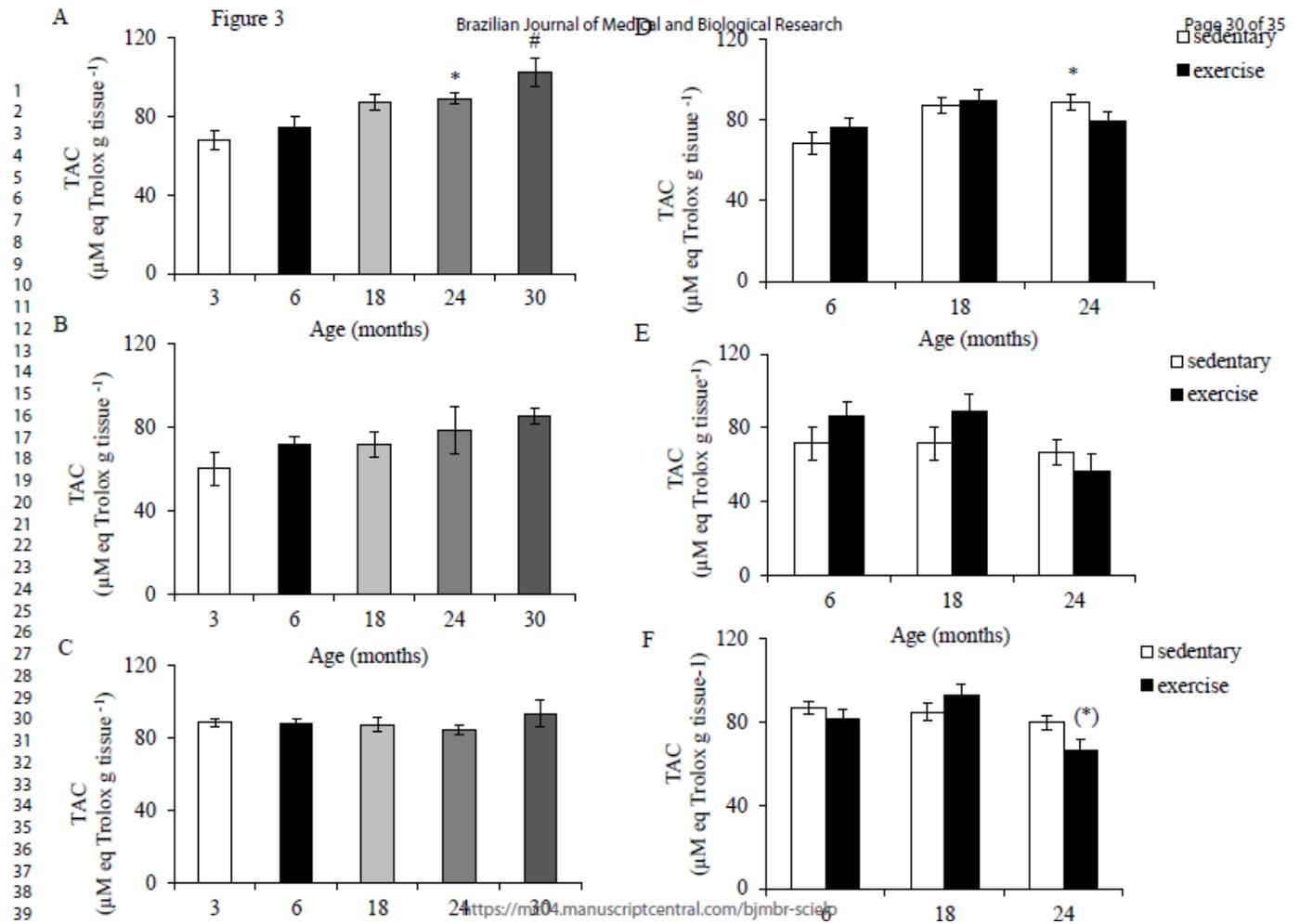
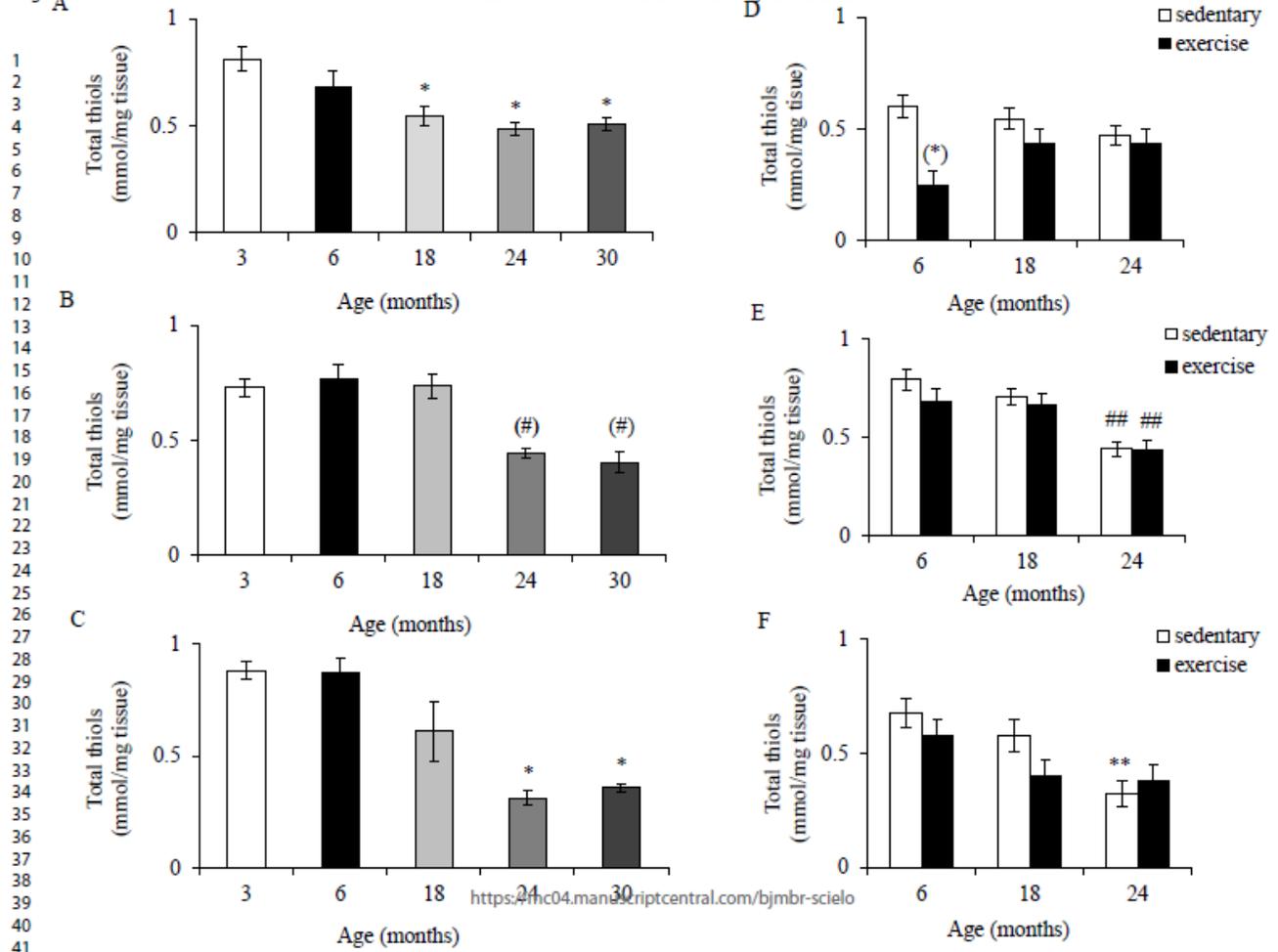


Figure 4



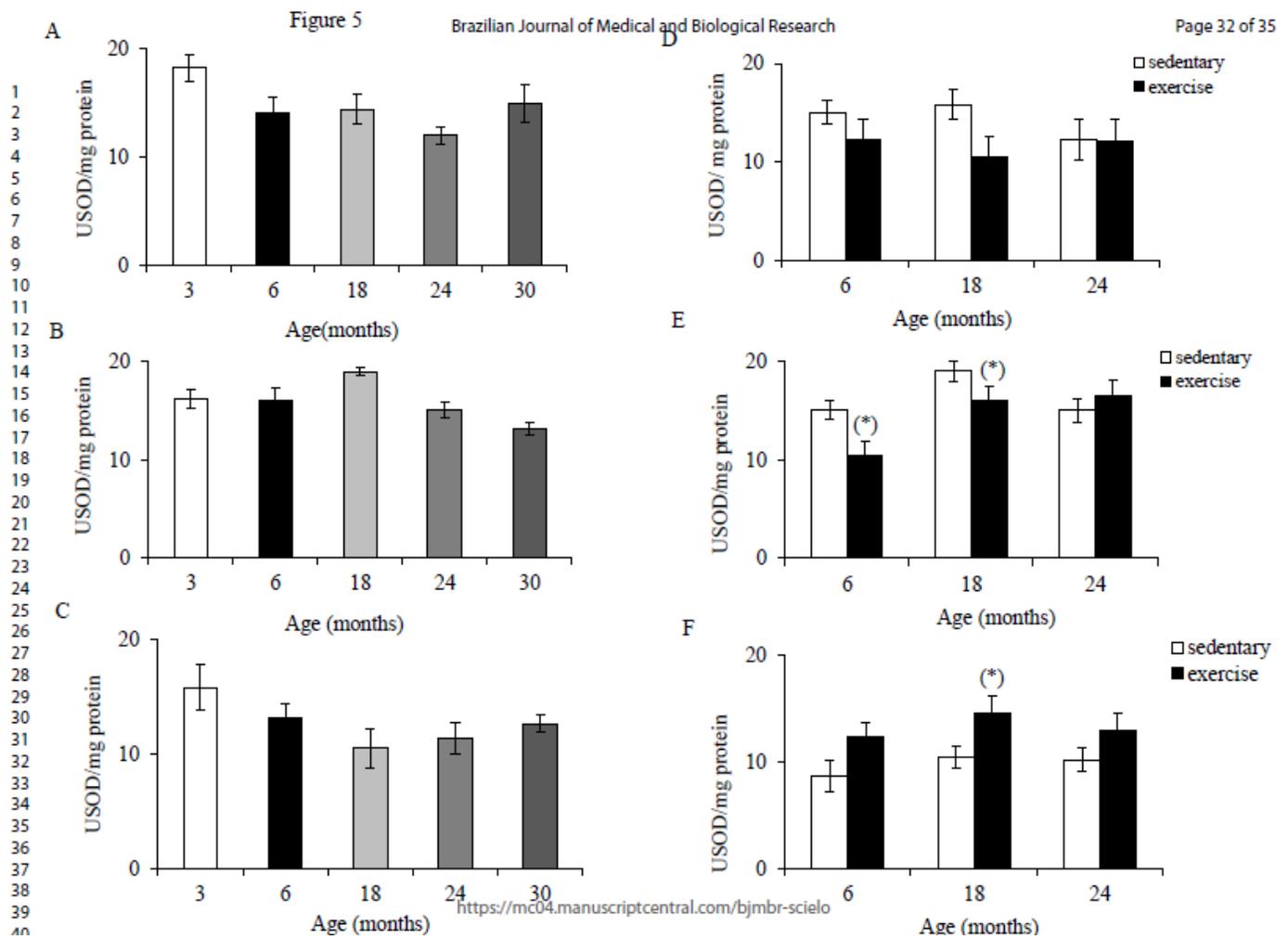
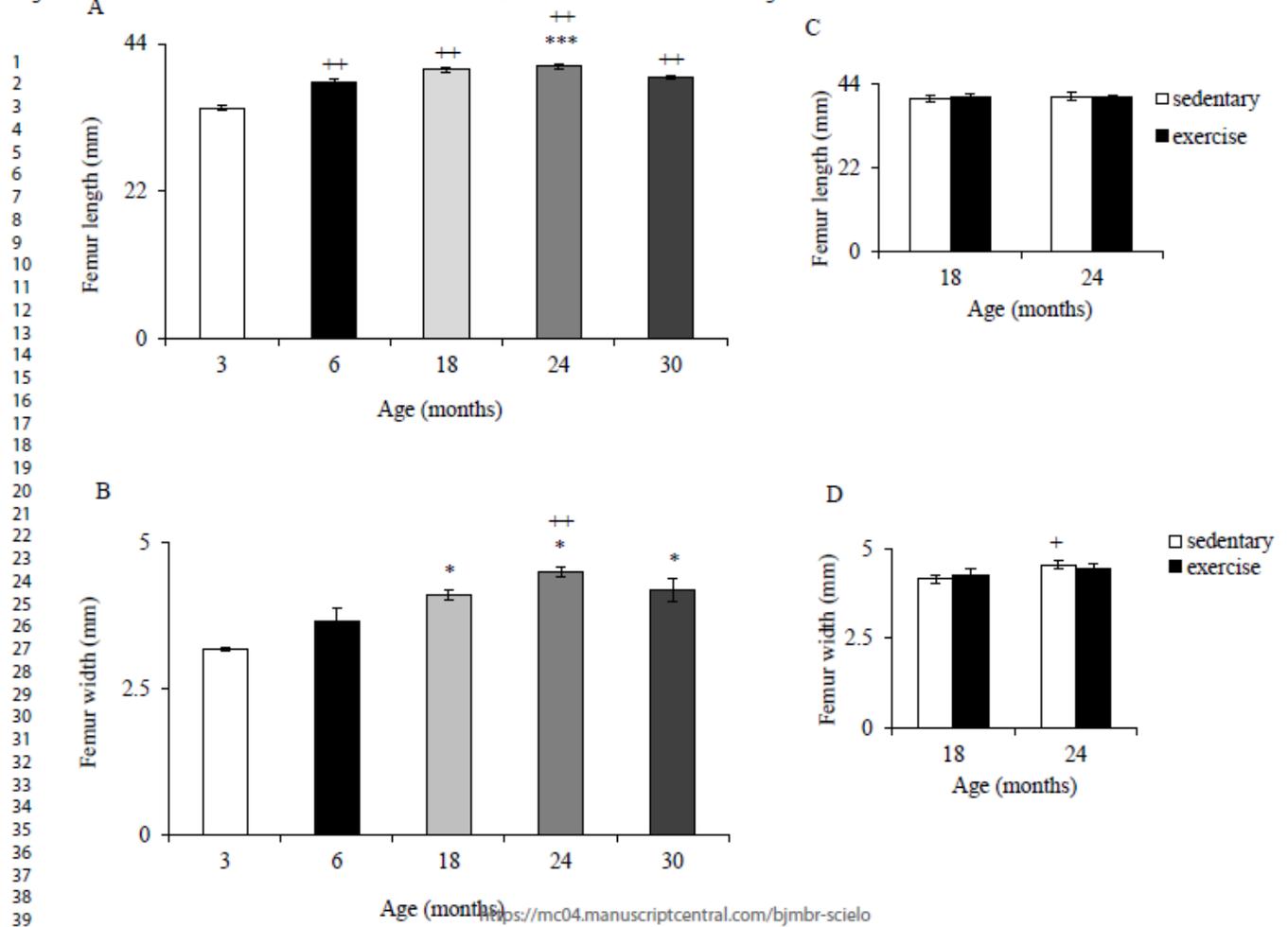


Figure 6



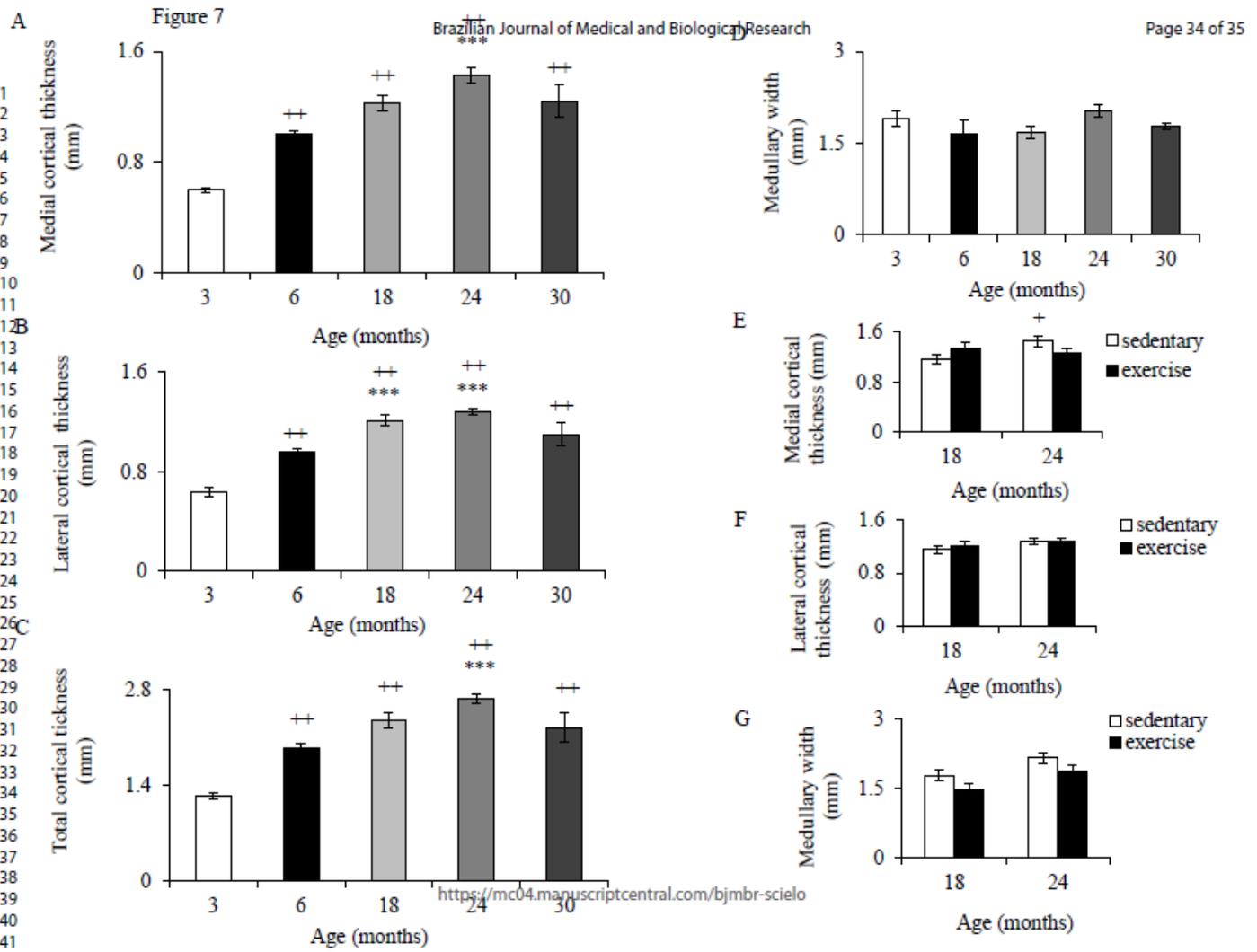


Table 1: Radiographic measurements of femur from Wistar rat of different ages.

	Age (months)								
	Sedentary					Exercise			
	3	6	18	24	30	6	18	24	
Sclerosis in cortical	-	-	+	++	++	-	-	++	
bone			(1/5)	(1/6)	(1/3)			(2/4)	
Sclerosis in	-	-	-	+++	++	-	-	-	
medular canal				(3/6)	(1/3)				
Increased	-	-	-	+++	+++	-	-	++	
Radiolucency				(1/6)	(2/3)			(1/4)	
Non-uniform	-	-	-	-	+	-	-	-	
Radiopacity					(1/3)				
Bone deformity	-	-	++	++	+	-	++	++	
			(2/5)	(1/6)	(1/3)		(1/3)	(1/4)	
Remodeling of	-	-	++	+++	-	-	++	+++	
femoral neck			(3/5)	(3/6)			(1/3)	(2/4)	
Fracture	-	-	-	-	-	-	-	-	
Osteophyte	-	-	-	present	-	-	-	-	
				(2/6)					

Exercise: 12 weeks of treadmill running

(-): absent.

Present: (+) light; (++) moderate; (+++) severe.

Parenthesis represents the number of rats exhibiting the radiomorphological change/total number of radiographs from femur.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou até o momento o efeito do envelhecimento e do exercício físico de baixa intensidade sobre as alterações no passo, IFI, equilíbrio e biomarcadores oxidativos em medula espinal e áreas encefálicas como tronco encefálico, cerebelo e córtex cerebral em ratos Wistar. Foi avaliado ainda o efeito dessas condições sobre indicador de perda de massa muscular esquelética, medidas radiográficas no fêmur, peso corporal, e valores plasmáticos de glicose, triglicerídeos, colesterol total e HDL colesterol.

Quanto ao envelhecimento, o ganho de peso corporal até os 24 meses, seguido de pequeno decréscimo aos 30 meses, foi também encontrado por outros autores em ratos Wistar (GHEZZI et al., 2012; ALTUN et al., 2007; BOUDET et al., 1988). A falta de alterações significativas nos valores plasmáticos de glicose em ratos de 3, 6, 18 e 24 meses também está de acordo com dados da literatura (GHEZZI et al., 2012). A redução nesse parâmetro em ratos idosos pode se relacionar à senescência. Foi demonstrado que o tempo médio de vida de ratos da linhagem Wistar é 29 a 30 meses (ALTUN et al., 2007). O aumento significativo no colesterol total e HDL colesterol também foi observado por outros autores durante o envelhecimento de ratos Wistar (GHEZZI et al., 2012; BOUDET et al., 1988). A falta de variação significativa nos valores plasmáticos de triglicerídeos pode estar associada à alimentação dos ratos previamente a sua morte. Segundo BOUDET et al. (1988), não houve variações significativas nos valores plasmáticos de triglicerídeos quando ratos foram alimentados normalmente antes da sua morte. Considerando todos os resultados acima descritos, e as similaridades com os dados da literatura, pode-se afirmar que os ratos usados no presente estudo mostraram alterações que são comumente encontradas durante o envelhecimento na linhagem de ratos Wistar.

Os estudos mostram que o avanço da idade modula continuamente aspectos básicos do comportamento, como locomoção (ALTUN et al., 2007) e equilíbrio (SMITH, 2016). Assim, nosso estudo analisou as respostas de ratos com diferentes idades aos testes da barra estreita e da marcação das patas com o intuito de mostrar déficits sensório-motores durante o envelhecimento. O pior desempenho de ratos velhos e idosos no teste da barra estreita, e as variações no comprimento da passada, estão de acordo com dados da literatura (ALTUN et al., 2007; BROWN et al., 2003). Porém, os estudos prévios não mostraram as respostas ao teste da

barra estreita em ratos com idade de 3 meses. Assim, os dados do presente estudo supriram essa lacuna na literatura. Além disso, pela primeira vez se mostrou que o comprimento da passada teve valor similar entre ratos com idades de 3 e 30 meses (SILVEIRA et al, 2019). Como um estudo recente mostrou que o comprimento da passada foi maior em ratos de meia-idade comparado a ratos de 3 meses (von LEDEN et al., 2017), e medidas obtidas nos ratos de 3 meses desse estudo foram similares às encontradas em nosso estudo para ratos dessa idade, essa similaridade reforça não apenas as medidas obtidas nos ratos de 3 meses, mas também as medidas feitas nos ratos das demais idades. Assim, pode-se sugerir que o comprimento da passada aumenta com o avanço da idade, mas em ratos idosos ele retorna a valores similares ao que se observa em animais jovens.

Assim como o comprimento da passada, o comprimento do passo também aumentou de ratos adultos a velhos, mas reduziu em ratos idosos. Curiosamente, o valor do comprimento do passo de ratos idosos foi similar àqueles encontrados em ratos jovens. Assim, pode-se sugerir que os comprimentos do passo e da passada aumentam durante o envelhecimento até a idade de 24 meses, seguido por pequena redução. Por este motivo, aos 30 meses os valores encontrados são similares àqueles de ratos jovens, apesar das mudanças no peso corporal e tamanho dos animais.

Diferente dos comprimentos do passo e da passada, a largura do passo aumentou durante o envelhecimento, e o maior valor foi encontrado aos 30 meses. Sabe-se que um passo estável requer controle da posição do centro de massa corporal em relação à base de sustentação (BRUJIN; DIEEN, 2018; MUSIENKO et al., 2012). Assim, é possível que o aumento na largura do passo seja uma estratégia compensadora para manter o centro de massa corporal dentro de uma base estável de sustentação nos ratos idosos. Como a locomoção depende do *status* postural em cada momento durante o passo, com ou sem perturbações (MUSIENKO et al., 2012), não se pode descartar que as alterações no comprimento do passo e da passada, e largura do passo, contribuíram para o pior desempenho de ratos velhos e idosos no teste da barra estreita.

Todavia, é preciso também considerar o efeito da idade sobre a massa muscular esquelética. É sabido que a massa muscular esquelética declina com o avanço da idade em humanos e ratos (PANNÉREC et al., 2016; BROWN et al., 2003). Segundo PANNÉREC et al. (2016), a sarcopenia se traduz diretamente em déficits na locomoção. Como nossos resultados da relação peso do músculo sóleo e peso corporal mostraram tendência à redução nos ratos velhos e idosos, esse resultado sugere queda na massa muscular esquelética durante o envelhecimento.

Assim, não se pode descartar a contribuição da sarcopenia nas respostas de ratos velhos e idosos ao teste da barra estreita e ao teste da marcação das patas, pois o passo requer coordenação entre o tronco e os membros para mover o corpo para frente, enquanto mantendo o equilíbrio dinâmico (MUSIENKO et al., 2012).

O IFI, outro parâmetro analisado no teste de marcação das patas, também mudou com o avanço da idade. Este índice constitui uma medida fácil e indicativa da condição do nervo isquiático em ratos, e é facilmente aplicável a grandes populações (de MEDINACELI et al., 1982). Segundo esses autores, os valores do IFI estão na faixa de normalidade quando próximos a zero para ratos jovens. Como os valores do IFI obtidos em ratos de 3, 6 e 18 meses foram próximos a zero, esse resultado indica função normal nesse nervo. Porém, o IFI foi reduzido em ratos de 24 e 30 meses (-16 para ratos de 24 meses, e -19 para ratos de 30 meses). O IFI é considerado um índice muito sensível (de MEDINACELI et al., 1982). Assim, as alterações no valor do IFI em ratos velhos e idosos pode ser indicativo de lesão nesse nervo. De fato, diversos estudos mostraram alterações morfofuncionais em nervo com o avanço da idade. Em nervo tibial de ratos com idade de 24 meses se observou redução na área ocupada por axônios mielinizados e não-mielinizados, na densidade de fibras mielinizadas e no número de fibras mielinizadas com morfologia similar a encontrada em ratos de 10 meses (KRAUSE NETO et al., 2017). Em humanos, o envelhecimento está associado a uma atrofia significativa em fibras mielinizadas de grande calibre no nervo isquiático, o que ocorre paralelo a um aumento em fibras nervosas com aspecto regenerado, por possuírem camada de mielina muito mais fina (UGRENOVIC et al., 2016). Em um estudo longitudinal em nervo isquiático de camundongo da linhagem C57BL/6J, os autores observaram um acúmulo crescente em muitas proteínas relacionadas ao citoesqueleto e funções proteolíticas nesse nervo, o que levou os autores a sugerirem prejuízo no transporte axonal e disfunção em mecanismos de degradação durante o envelhecimento (KRISHNAN et al., 2016). Segundo esses autores, a proporção de axônios com agregados elétron-densos duplicou em camundongos com idades entre 17 e 27 meses. Assim, as alterações nos valores do IFI em ratos de 24 e 30 meses possivelmente se relaciona a alterações morfofuncionais nesse nervo.

Os estudos mostram que o envelhecimento também provoca alterações progressivas em parâmetros fisiológicos, incluindo aumento de ROS no SNC. Em medula espinal, o avanço da idade aumentou a oxidação de proteínas (von LEDEN et al., 2017). No encéfalo, a vulnerabilidade ao estresse oxidativo parece variar nas diferentes regiões encefálicas (KRUK et

al., 2019; STEFANATOS; SANZ, 2018; SOUZA et al., 2018). Outro sistema que modifica ao longo do envelhecimento é o musculoesquelético (KRUK et al., 2019). Para facilitar o entendimento do leitor, a seguir é discutido primeiramente os resultados referentes aos efeitos do envelhecimento no tecido nervoso, abordando inicialmente os efeitos em medula espinal seguido daqueles em encéfalo e em medidas radiográficas em fêmur. Após, será apresentada a discussão referente ao efeito do exercício físico sobre os parâmetros avaliados no presente estudo.

O envelhecimento provocou aumento na SAG e nos valores de H_2O_2 em medula espinal lombossacral. Como o avanço da idade aumentou a formação de ROS em medula espinal (von LEDEN et al., 2017; YONUTAS et al., 2015), nossos resultados estão de acordo com os dados da literatura. Todavia, nosso estudo é o primeiro a mostrar que o aumento em ROS está associado a acréscimos na SAG e H_2O_2 na medula espinal. Como aumento na formação de ROS pode ultrapassar o nível de tolerância das células e levar a dano oxidativo, apoptose e necrose (RADAK et al., 2013), é provável que o aumento na SAG e H_2O_2 durante o envelhecimento contribuiu para as alterações no passo e no equilíbrio de ratos velhos e idosos. A medula espinal é um conector e integrador vital, o qual transmite e processa informações sensoriais e motoras entre o encéfalo e a periferia, a fim de controlar uma variedade de processos fisiológicos (PARKINSON et al., 2016), incluindo locomoção e equilíbrio (MUSIENKO et al., 2012). Como a SAG e os valores de H_2O_2 estavam aumentados na medula espinal dos mesmos ratos que apresentaram déficits no teste da barra estreita e variações em parâmetros do passo, não se pode descartar a possibilidade de relação entre os resultados. Porém, é impossível nesse momento estabelecer uma relação direta entre ROS e as respostas comportamentais avaliadas no presente estudo. Em células, os efeitos das ROS podem ser benéficos ou maléficos (PATEL; SESTI, 2016). Assim, uma relação entre déficit comportamental e aumento na SAG e H_2O_2 em ratos velhos e idosos é possível, embora estudos mais detalhados sejam necessários para o completo entendimento desta relação.

Interessantemente, a SAG e os valores de H_2O_2 foram similares no segmento lombossacral da medula espinal de ratos com idades de 24 e 30 meses. Uma possível explicação para a similaridade pode ser alterações funcionais induzidas pela idade. Foi demonstrada produção elevada de H_2O_2 em mitocôndrias obtidas de encéfalo de ratos com 24 meses de idade (PETROSILLO et al., 2013). Segundo esses autores, o conteúdo de citocromo c (complexo enzimático da cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial interna, a qual

catalisa a transferência de elétron do citocromo c para o oxigênio molecular) permaneceu constante em ratos de 24 meses, embora suas funções estivessem prejudicadas. Assim, é possível que a inexistência de mudanças significativas na SAG e H_2O_2 pode estar relacionada à manutenção do conteúdo da enzima citocromo c, paralelo ao déficit em sua funcionalidade em ratos de 30 meses. Porém, é preciso também considerar que a elevação na SAG e H_2O_2 nas idades de 24 e 30 meses pode estar associada a alterações neuroquímicas relacionadas à idade. É sabido que há alterações em neurotransmissores no tecido nervoso de ratos envelhecidos, sendo a medula espinhal mais prejudicada do que outras regiões do SNC em ratos com idade de 30 meses (VIRGILI et al., 2001). As ROS são geradas nas células em condições oxidativas e ativam rotas de sinalização celular (WINTERBOURN, 2015).

Nosso estudo também analisou conteúdo de tióis totais na medula espinhal, por estes constituírem principal sistema antioxidante no corpo e desempenharem papel significativo nas defesas frente às ROS (PRAKASH et al., 2009). Os resultados mostraram que o conteúdo de tióis totais diminuiu gradativamente durante o envelhecimento, mas a redução foi muito mais acentuada no tecido de ratos idosos. A queda em tióis totais com o avanço da idade está de acordo com um estudo anterior realizado em ratos Wistar com idade de 24-26 meses (BALU et al., 2005). Assim, nosso estudo não apenas reforça a redução em tióis totais com o avanço da idade, mas adiciona novidade por mostrar pela primeira vez os valores de tióis totais na medula espinhal de ratos com idades de 18 e 30 meses. É sugerido que a queda em tióis totais é um indicador de redução na eficiência do mecanismo de S-tioilação, o que estabelece risco aumentado de oxidação irreversível de Grupos $-SH$ de proteínas (BALU et al., 2005). Com base nessa sugestão, os resultados do presente estudo indicam que a oxidação irreversível de grupos $-SH$ de proteínas ocorre ao longo do envelhecimento, mas é maior na medula espinhal de ratos velhos e idosos. É sabido que a oxidação de proteínas modifica aminoácidos e a agregação e fragmentação de proteínas (BALU et al., 2005). Desta forma, pode-se sugerir que as alterações em proteínas estão elevadas em medula espinhal de ratos idosos. Apesar de prematuro especular sobre a contribuição das alterações em proteínas nas respostas comportamentais dos ratos velhos e idosos, a relação entre os eventos parece possível devido ao importante papel da medula espinhal na locomoção e equilíbrio, como foi previamente apresentado.

A diminuição no conteúdo de tióis totais pode ter alguma relação com o H_2O_2 . A oxidação de tióis ocorre por um mecanismo envolvendo dois-elétrons, comumente com

envolvimento de H_2O_2 (WINTERBOURN, 2015). Segundo esse autor, o superóxido reage com tiol, porém, essa reação é lenta, no mínimo para moléculas pequenas, e a reação não é uma transferência direta de elétrons, mas ela gera radical tiil, o qual regenera superóxido e forma *dissulfide* como principal produto. Esta é uma reação em cadeia, mas a mesma é breve, possivelmente pelo motivo do superóxido reagir com intermediários e, assim, não é provável uma competição entre tióis e SOD (WINTERBOURN, 2015). De fato, a atividade da enzima SOD, a qual converte ânion superóxido em H_2O_2 (POLJSAK et al., 2013), aumentou na medula espinal durante o envelhecimento.

Apesar de o avanço da idade reduzir tióis totais, a TAC aumentou na medula espinal de ratos com idades de 6, 18, 24 e 30 meses. Os tióis parecem constituir o principal determinante da TAC em homogeneizado de tecidos (BALCERCZYK et al., 2003). Porém, a TAC representa componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SAHIN et al., 2014). Segundo BALCERCZYK et al. (2003), a adaptação ao estresse oxidativo pode envolver mobilização de outros mecanismos do que aumento no conteúdo de tióis. No presente estudo, a atividade da enzima SOD aumentou na medula espinal durante o envelhecimento. Assim, pode-se pensar que este acréscimo tenha alguma relação com o aumento da TAC. As prováveis alterações complexas entre sistemas antioxidantes e pró-oxidantes pode estar contribuindo para a ausência de variações significativas nos valores de hidroperóxidos lipídicos na medula espinal com o avanço da idade.

No encéfalo, as variações em parâmetros de estresse oxidativo foram dependentes da região. Em tronco encefálico e cerebelo, os resultados do presente estudo mostraram acréscimo pequeno nos valores de hidroperóxidos lipídicos em ratos com idade de 24 meses, mas o aumento foi significativo aos 30 meses. O aumento na oxidação de lipídeos em regiões encefálicas distintas parece ser evento comum durante o envelhecimento. Os valores de peróxidos lipídicos e hidroperóxidos lipídicos aumentaram gradativamente em tronco encefálico e cerebelo de ratos machos albinos de 6, 13, 19 e 24 meses comparado a 3 meses (GUPTA et al., 1991). Nossos resultados não apenas reforçam o aumento em tronco encefálico e cerebelo de ratos velhos, mas mostram pela primeira vez que o acréscimo é maior em ratos de 30 meses. A falta de alterações significativas aos 6, 18 e 24 meses pode se relacionar a bioenergética mitocondrial. Fatores como genética, proteômica e ambiente parecem influenciar a variações na bioenergética mitocondrial induzidas pelo envelhecimento (PANDYA et al., 2016).

Porém, diferente do que foi relatado por GUPTA et al. (1991), o presente estudo não encontrou alterações significativas no conteúdo de hidroperóxidos lipídicos em córtex cerebral de ratos velhos e idosos. Uma explicação plausível pode ser o uso de todo o telencéfalo no estudo de GUPTA et al. (1991), enquanto o presente estudo usou apenas córtices cerebrais. Todavia, o conteúdo de peróxidos lipídicos aumentou significativamente em córtex cerebral de ratos Wistar de 24 meses comparado a 3 meses (Souza et al., 2018), e em córtices frontal e temporal de ratos de 18 meses comparado a 10 meses (MIZUNO; OHTA, 1986). Nesses estudos, a determinação de peróxidos lipídicos foi feita pelo uso de técnica diferente da usada no presente estudo. Ainda, nosso estudo não avaliou hidroperóxidos lipídicos em regiões corticais específicas. Possivelmente estas sejam a causa da diferença entre nossos resultados e aqueles da literatura.

Nas áreas encefálicas avaliadas no presente estudo, o conteúdo de tióis totais reduziu significativamente em ratos velhos e idosos. Essa queda em tióis totais em regiões encefálicas, durante o envelhecimento, está de acordo com dados da literatura (MOYSE et al., 2019; SOUZA et al., 2018). A novidade do presente estudo é a demonstração de que a redução é similar em ratos com idades de 24 e 30 meses. Considerando que o conteúdo de tióis totais também reduziu em medula espinal lombossacral de ratos velhos e idosos, a queda em tióis totais parece ser evento comum no SNC de ratos envelhecidos. Como a queda em tióis totais se relaciona com diminuição no mecanismo de S-tiolação, como apresentado previamente, pode-se sugerir que este mecanismo está reduzido no SNC de ratos Wistar velhos e idosos.

Interessantemente, a TAC aumentou apenas em tronco encefálico de ratos mais velhos. Foi demonstrado que a TAC reduziu em córtex cerebral, cerebelo e tronco encefálico de ratos Wistar de 24 meses comparado a 3 meses (BRAIDY et al., 2014). No momento, não é possível explicar essa diferença, mas pode-se sugerir que a alteração na TAC induzida pelo envelhecimento depende do sexo na linhagem Wistar. Essa sugestão parece plausível porque diferenças sexuais foram observadas em valores de óxido nítrico e defesas antioxidantes em regiões encefálicas de rato (TASKIRAN et al., 1997). Considerando o aumento na TAC em tronco encefálico e medula espinal, pode-se sugerir que a alteração nesse parâmetro difere nessas regiões quando as mesmas são comparadas às mais superiores do neuroeixo. Porém, estudos mais detalhados são necessários para esclarecer essa sugestão. Contudo, a atividade da SOD não variou significativamente nas regiões encefálicas durante o envelhecimento. Assim, diferente da medula espinal, outros sistemas antioxidantes que não a atividade da SOD poderia ter sua

atividade aumentada ao longo do envelhecimento, e essa maior atividade contribuir para o acréscimo na TAC. Porém, não foram avaliados outros sistemas antioxidantes no presente estudo. Estudos futuros deste grupo de pesquisa abordarão essa questão.

A falta de alterações significativas na atividade da SOD durante o envelhecimento foi também observada em outros estudos com encéfalo de ratos de até 24 meses (MOYSE et al., 2019; SOUZA et al., 2018), o que torna novidade os dados de ratos com idade de 30 meses. A similaridade entre nossos dados e aqueles da literatura reforçam nossos resultados. Considerando a função da SOD, a manutenção de sua atividade indica que a conversão de ânion superóxido em H_2O_2 se mantém inalterada durante o envelhecimento. Porém, enquanto a atividade da SOD aumentou significativamente em medula espinal lombossacral de ratos velhos, o mesmo não ocorreu nas regiões encefálicas. Assim, a medula espinal parece exibir alterações na atividade da SOD que difere daquela do encéfalo durante o envelhecimento. É possível que esta diferença se relacione com função mitocondrial nesses tecidos. Segundo YONUTAS et al. (2015), a mitocôndria da medula espinal produz mais ROS e provoca mais dano oxidativo do que aquela no encéfalo, para qualquer idade do animal. Ademais, as alterações na função mitocondrial parecem ser dependentes da idade e da região encefálica (PANDYA et al., 2016).

Paralelo às alterações em parâmetros oxidativos, o presente estudo analisou o efeito do envelhecimento sobre medidas radiográficas no fêmur. O aumento no comprimento e largura desse osso durante o envelhecimento está de acordo com dados da literatura (IIDA; FUKUDA, 2002). Nesse estudo, os autores observaram que a densidade mineral total do fêmur aumentou até 24 meses, seguido por pequeno decréscimo aos 30 meses, e essas alterações ocorreram paralelamente às mudanças no peso corporal. Como nosso estudo observou que o peso corporal de ratos Wistar aumentou até 24 meses, seguido por pequena queda aos 30 meses, é provável que as alterações no comprimento e largura do fêmur se relacionem às mudanças no peso corporal dos ratos.

As alterações que ocorreram na cortical estão de acordo com dados da literatura onde foram usados outros métodos na avaliação (IIDA; FUKUDA, 2002; CUNNINGHAM et al., 2018). A ausência de mudanças significativas na largura da medular sugere que o envelhecimento não induziu expansão nessa região do fêmur. Recentemente se observou que a medular não alterou significativamente em fêmur de camundongos de 10 e 16 meses de idade (BLANTON, 2018). Assim, pode-se pensar que a falta de expansão da medular em fêmur é característica da

ordem Rodentia. Como a área de secção transversal da medular foi significativamente maior em homens velhos do que jovens, e essa alteração pareceu indicar reabsorção endosteal (ALLEN et al., 2012), pode-se sugerir que essa alteração não ocorreu em fêmur de ratos velhos. Segundo Iida and Fukuda (2002), enquanto a área cortical diminuiu, a trabecular aumentou com o avanço da idade, e isto poderia ocorrer devido a predominância de formação periosteal em vez de reabsorção endosteal devido ao padrão de remodelação em ratos, o que indicaria afinamento na espessura da cortical ao longo do envelhecimento. De fato, a radioluscência e o remodelamento no colo do fêmur aumentou em ratos velhos e idosos, o que poderia estar indicando redução na massa óssea. De acordo com LÓPEZ-LÓPEZ (2015), a densidade mineral óssea está marginalmente associada a uma maior frequência de lesões periapicais radioluscentes. A ocorrência de esclerose na cortical e medular pode estar indicando presença de processos inflamatórios induzidos pelo envelhecimento. Foi demonstrado que a produção de TNF- α e interleucina-6, citocinas pró-inflamatórias, estava aumentada em células mesenquimais do estroma de medula óssea de ratos velhos comparada a de animais jovens (FENGER et al., 1993). Considerando todos os dados radiográficos, pode-se sugerir que a radiografia permitiu inferir as alterações características em fêmur induzidas pelo envelhecimento. É possível que a ausência de osteófito em fêmur de ratos de 30 meses se relacione ao pequeno número de animais. Estudos futuros com maior número de ratos com idade de 30 meses poderão esclarecer essa questão.

O presente estudo demonstrou ainda o efeito do exercício regular de baixa intensidade iniciado em fase tardia da vida sobre parâmetros metabólicos, comportamentais, oxidativos e radiográficos em ratos adultos, de meia-idade e velhos, uma vez que a atividade física regular constitui estratégia benéfica aos efeitos do envelhecimento e ainda há questões em aberto sobre intensidade e/ou frequência mais indicada para obtenção do benefício (FALCK et al., 2019; PARTADIREDDA et al., 2019; de SOUZA et al., 2018).

Os resultados mostraram que o programa de exercício usado no presente estudo não modificou significativamente o ganho de peso corporal durante o envelhecimento, assim como os valores plasmáticos de glicose e triglicerídeos, o que está de acordo com dados da literatura (FENGER et al., 1993). O programa de exercício também não foi capaz de reduzir o valor de colesterol total e HDL colesterol, e prevenir a redução na relação peso do músculo sóleo e peso corporal, usado como indicador de perda da massa muscular esquelética. Foi demonstrado que ratos submetidos ao exercício de baixa intensidade por 12 semanas tiveram redução no colesterol

total (SINGULANI et al., 2017). O treinamento contínuo de intensidade moderada foi capaz de prevenir a queda no peso relativo do músculo sóleo em ratas da linhagem Sprague Dawley com idade de 18 meses (FENGER et al., 1993). O exercício de baixa intensidade (10 sessões de natação, realizado 5 vezes/semana, com duração de 45 minutos) preveniu o declínio induzido pelo envelhecimento na massa muscular (BROWN et al., 2003). Como a diferença entre nossos resultados e aqueles da literatura foi o tipo de programa de exercício e a frequência e/ou intensidade do exercício, é provável que esses fatores sejam a causa das diferenças nos resultados de colesterol e sarcopenia, como mostrado para exercício de intensidade moderada e alta. Foi demonstrado que o exercício de alta e moderada intensidade provocam respostas diferentes em indivíduos (CHALIMONIUK et al., 2015). Porém, estudos futuros com ratos de diferentes idades submetidos a exercício de intensidade e frequência diferentes são necessários para esclarecer nossa sugestão.

Interessantemente, o exercício físico regular de baixa intensidade não provocou alterações significativas nos parâmetros do passo avaliados, mas melhorou significativamente o desempenho de ratos velhos no teste da barra estreita. Este teste avalia o equilíbrio simples (estático) no animal (ROND-REIG et al., 1997). É sabido que o caminhar requer uma complexa ativação de unidades motoras, a qual é coordenada por retroalimentação sensorial integrada em áreas corticais (FENG; YUAN, 2015). Nesse contexto, os resultados do presente estudo indicaram que o exercício de baixa intensidade, realizado por 12 semanas, melhora o equilíbrio estático, mas não a coordenação motora complexa envolvida no passo. Como as características do caminhar dependem do *status* postural a cada passo, com ou sem perturbações (GARCIA-MESA et al., 2016; MUSIENKO et al., 2012), não se pode descartar a contribuição da melhora no equilíbrio sobre parâmetros do passo. É possível que a falta de significância nos resultados relativos ao passo seja decorrente da necessidade de uma maior frequência e/ou intensidade do exercício. Em ratos submetidos à natação (10 sessões, realizadas 5 vezes/semana, com duração de 45 minutos cada sessão), onde diferentes obstáculos tinham que ser vencidos durante os testes, se observou melhora nos comprimentos do passo e da passada, e na largura do passo, em ratos velhos (BROWN et al., 2003). É possível que alterações no programa de exercício de baixa intensidade também provoquem mudanças no IFI. Desta forma, o efeito de diferentes frequência e intensidade de exercício de baixa intensidade sobre parâmetros do passo deverão ser

futuramente avaliadas para estabelecer a condição mais adequada para induzir alterações benéficas no passo.

A duração e/ou intensidade de exercício provavelmente também sejam fatores importantes para a ausência de alterações significativas nos parâmetros oxidativos em medula espinal. Recentemente foi demonstrado que a realização de exercício moderado em esteira por período prolongado (com 50% da capacidade máxima, realizado por 40 minutos/dia, 5 vezes/semana, durante 10 semanas) reduziu significativamente os valores de H₂O₂ em medula espinal de ratos velhos da linhagem Lewis (MELO et al., 2019).

Diferentemente da medula espinal, o exercício aumentou os valores de hidroperóxidos lipídicos em tronco encefálico de ratos jovens e de meia-idade. Porém, ele reduziu esse parâmetro em tronco encefálico aos 24 meses, sem alterações significativas em cerebelo e córtex cerebral em qualquer idade. Segundo JOLITHA et al. (2006), as diferenças na peroxidação de lipídeos em distintas regiões encefálicas poderia ser atribuída ao diferente consumo de oxigênio. Uma meta-análise recente mostrou que enquanto 62% das pesquisas avaliadas não relataram acréscimo na lipoperoxidação de lipídeos em córtex cerebral, tronco encefálico e cerebelo após a realização de exercício moderado, 15% do total dos estudos considerados na meta-análise encontraram aumento nesse parâmetro em regiões encefálicas (de SOUZA et al., 2018). Como os autores comentaram que as diferenças pareciam relacionar-se a intensidade e/ou frequência do exercício, esta pode ser também a causa das diferenças entre nossos resultados e aqueles da literatura.

As diferenças em intensidade e/ou frequência do exercício também pode ser a causa de divergências nos resultados dos parâmetros antioxidantes nas regiões encefálicas. Segundo de SOUZA et al. (2018), os protocolos de exercício em ratos com duração de 20 a 30 minutos, por um período de até 8 semanas, não provocaram alterações no equilíbrio enzimático antioxidante, mas exercícios aeróbicos por tempo maior induziram aumento nas atividades das enzimas catalase e SOD. Contudo, o presente estudo revelou queda na atividade da SOD em cerebelo de ratos com idades de 6 e 18 meses, mas aumento dessa atividade aos 18 meses em córtex cerebral. Foi demonstrado que o treinamento de endurance de intensidade moderada aumentou significativamente a atividade de antioxidantes, como a enzima SOD, principalmente em neocórtex, mas acréscimos menores foram encontrados em cerebelo e estriado em ratos Wistar adolescentes (CHALIMONIUK et al., 2015). Assim, não se pode descartar a possibilidade de que

as diferenças entre nossos resultados e os da literatura se devem ao programa de exercício usado no presente estudo.

A diferença na intensidade e/ou frequência do exercício pode também ser a causa da falta de recuperação do conteúdo de tióis totais nas diferentes regiões encefálicas. Em ratos adolescentes, o treinamento de endurance aumentou o conteúdo de glutathione total em córtex cerebral, cerebelo e mesencéfalo (CHALIMONIUK et al., 2015). Porém, o exercício em esteira por 7,5 semanas não alterou significativamente os valores de glutathione em córtex cerebral, tronco encefálico e estriado de ratos jovens (SOMANI et al., 1995). Interessantemente, nosso estudo mostrou queda significativa no conteúdo de tióis totais em tronco encefálico de ratos de 6 meses que realizaram o exercício de baixa intensidade. Este resultado pode se relacionar a mecanismos diferentes estimulados pelo exercício nessa idade. Foi sugerido que o estresse oxidativo é capaz de promover alterações em diferentes vias dependendo não apenas da quantidade de ROS e espécies reativas de nitrogênio, mas do tipo da espécie reativa e de seus efeitos posteriores à sua formação (KRUK et al., 2019).

O exercício foi capaz também de induzir melhora em medidas radiográficas no fêmur. Após sua realização, se observou diminuição na radiolucência e ausência de esclerose na medular. Considerando a discussão anteriormente apresentada sobre estas medidas em fêmur, os resultados seguem na direção de um efeito benéfico do exercício sobre a perda de massa óssea induzida pelo envelhecimento. Recentemente se mostrou que exercício (corrida em esteira por 40 minutos/dia, 3 vezes/semana, durante 8 semanas) induz alterações que vão na direção de reverter os efeitos do envelhecimento em medula óssea de camundongos machos velhos (BAKER et al., 2018). Em ratas Wistar velhas, o treinamento de força foi capaz de desencadear respostas fisiológicas que resultaram em alterações no microambiente ósseo, de modo a proporcionar benefícios a parâmetros biomecânicos nesse tecido (SINGULANI et al., 2017). Todavia, um estudo recente mostrou que o exercício de intensidade moderada, mas não o de baixa intensidade, realizado 4 vezes/semana durante 4 semanas, retornou o número de osteoclastos de volta a normalidade, o qual tinha sido alterado pelo envelhecimento induzido por d-galactose (PARTADIREDDI et al., 2019). Porém, como no presente estudo se encontrou redução na radiolucência no fêmur de ratos velhos que realizaram exercício, é possível que o tempo maior de exercício esteja indo na direção de menor ressonância óssea. Mais estudos são necessários para esclarecer essa questão.

Considerando os resultados obtidos por nós até o momento, pode-se sugerir que as alterações induzidas pelo exercício regular de baixa intensidade nos parâmetros oxidativos no SNC e nas medidas radiográficas do fêmur estão contribuindo para a melhora no equilíbrio de ratos velhos. Essa relação é plausível uma vez que as determinações foram feitas usando o mesmo animal. Outro apoio é a sugestão de que o exercício induz melhora pequena no equilíbrio e flexibilidade, mas promove benefícios moderados a grandes na capacidade de força e funcionalidade do corpo, esses últimos com papel importante na manutenção de uma independência em humanos velhos e idosos (FALCK et al., 2019). Todavia, é preciso considerar que nosso estudo teve uma forte limitação: o pequeno número de ratos por grupo. Essa limitação enfraqueceu comparações entre os grupos e, assim, poderia ter induzido resultados falso negativos. Um apoio a essa sugestão foi a comparação estatística que, na maior parte das vezes, resultou em resultados limítrofes na direção de significância entre as comparações. Isso pode ser visualizado em uma observação detalhada das figuras. Assim, não é possível afirmar que o exercício regular de baixa intensidade não modifica parâmetros do passo e oxidativos em medula espinal, e que ele é incapaz de prevenir a perda de atividade de antioxidantes no SNC, as quais foram induzidas pelo envelhecimento. Essa questão precisa ser avaliada em um número maior de ratos. Também necessita ser feito comparações entre as respostas dos parâmetros aqui abordados em condições de exercício de baixa intensidade com diferentes frequência e intensidade. Deve ser também feito estudos dos parâmetros comportamentais, oxidativos e radiográficos em situação de exercício de moderada e alta intensidade, a fim de comparação com os de baixa intensidade. A realização dessas comparações poderá estabelecer a intensidade de exercício necessária para prevenir alterações induzidas pelo envelhecimento. Porém, apesar de limitações, nossos dados em conjunto (para revisão ver Figura 8) reforçam o benefício do exercício de baixa intensidade sobre o equilíbrio e segue na direção de efeito benéfico desse tipo de exercício sobre passo, funcionalidade do nervo isquiático, parâmetros oxidativos no SNC, e perda de massa óssea e muscular. Assim, os dados do presente estudo se somam àqueles da literatura que mostram que exercício físico é uma das melhores estratégias para um envelhecimento saudável.

O envelhecimento provocou pior desempenho no teste da barra estreita, aumentou os comprimentos da passada e do passo, aumentou a largura do passo, reduziu o IFI, aumentou o comprimento e a largura do osso fêmur, e determinou nesse osso aumento em sua região cortical, esclerose na cortical e na cavidade medular, e radiolúcência aumentada.

O exercício melhorou o desempenho no teste da barra estreita, não mudou significativamente o comprimento da passada e do passo, a largura do passo, o IFI, mas reduziu a esclerose na cavidade medular e a radiolúcência no osso fêmur.

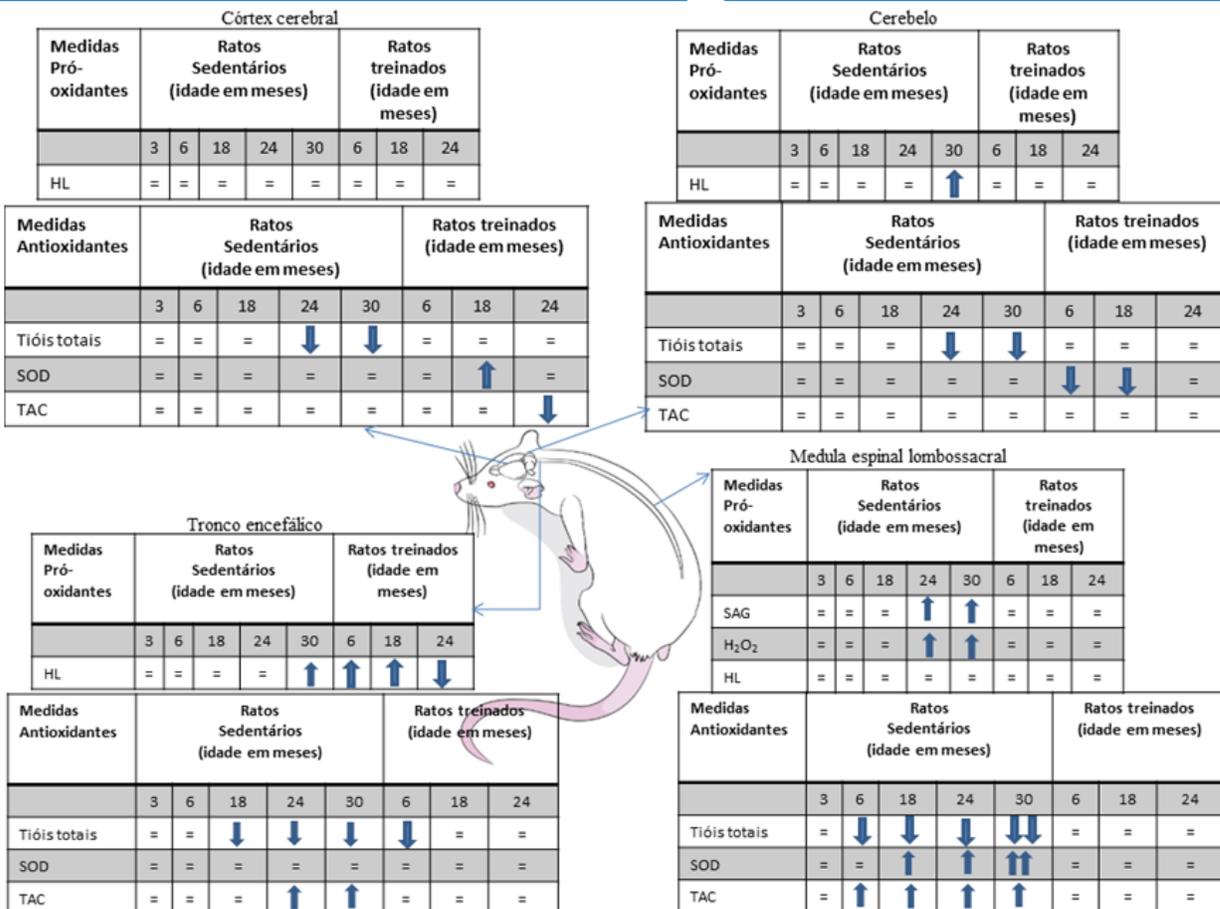


Figura 8: Esquema mostrando breve resumo dos resultados do presente trabalho referentes aos parâmetros do passo e equilíbrio, biomarcadores oxidativos no sistema nervoso central, e alterações no osso fêmur de ratos sedentários e exercitados. Foram omitidos os dados dos efeitos do envelhecimento e do exercício de baixa intensidade em esteira sobre peso corporal, valores plasmáticos de glicose, triglicérides, colesterol total e HDL colesterol, relação entre peso do músculo sóleo e peso corporal, e medidas radiográficas no fêmur. HL: hidroperóxidos lipídicos; TAC: capacidade antioxidante total; SOD: superóxido dismutase (Elaborado pela autora).

7- CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou os efeitos do envelhecimento e do exercício físico regular de baixa intensidade em esteira sobre: 1) parâmetros da marcha e equilíbrio; 2) alterações de massa muscular esquelética e aspecto radiográfico do osso fêmur; e 3) biomarcadores oxidativos em medula espinhal, tronco encefálico, cerebelo e córtex cerebral em ratos Wistar machos.

Os resultados em ratos sedentários mostraram que o envelhecimento:

- Aumentou os comprimentos da passada e do passo até os 24 meses, seguido de pequena redução aos 30 meses; aumento gradativo na largura do passo, com largura maior na idade de 30 meses.
- Determinou índice funcional do isquiático com valores na faixa de normalidade até 18 meses; aos 24 e 30 meses houve redução nesse índice, um indicativo de perda de funcionalidade nesse nervo, nessas idades.
- Aumentou o número de deslizos das patas traseiras durante a travessia na barra estreita, bem como o tempo gasto nesse trajeto, todos indicativos de perda de equilíbrio corporal.
- Provocou diminuição na massa muscular esquelética, e essa mudança correlacionou negativamente com o peso corporal.
- Aumentou a geração de ânion superóxido e a formação de peróxido de hidrogênio em medula espinhal lombossacral, paralelamente a uma redução nos tióis totais, aumentos na capacidade antioxidante total e atividade da enzima superóxido dismutase, sem qualquer alteração significativa em hidroperóxidos lipídicos nesse tecido.
- Aumentou hidroperóxidos lipídicos no tronco encefálico e cerebelo aos 30 meses, mas não mudou significativamente esse parâmetro em córtex cerebral; reduziu tióis totais em tronco encefálico, cerebelo e córtex cerebral; aumentou a capacidade antioxidante total apenas em tronco encefálico aos 24 e 30 meses; e não alterou a atividade da enzima superóxido dismutase nessas regiões encefálicas.
- Aumentou o comprimento e a largura do osso fêmur; aumentou a espessura na cortical, em suas regiões lateral, medial e total (medial+lateral), sem alterar significativamente a largura da cavidade medular desse osso; ainda no fêmur: ocorreu esclerose na cavidade medular e cortical;

aumento na radiolucência; radiopacidade não uniforme; deformidade óssea; remodelamento em pescoço femoral; e presença de osteófitos.

- Aumentou peso corporal até os 24 meses, seguido de pequeno decréscimo até os 30 meses; em plasma: aumentou o colesterol total e HDL colesterol, reduziu a glicemia, sem mudar significativamente os triglicérides, todas alterações comumente encontradas durante o envelhecimento em ratos sedentários.

O exercício regular de baixa intensidade, realizado 3 vezes/semana, durante 12 semanas:

- Reduziu o número de deslizos e o tempo gasto na travessia da barra estreita, indicadores de melhora no equilíbrio corporal.

- Reduziu a ocorrência de esclerose em cavidade medular e diminuiu a radiolucência no fêmur, modificações essas sugestivas de prevenção de perda óssea.

- Não alterou significativamente os parâmetros do passo, a perda de massa muscular esquelética e as alterações nos parâmetros oxidativos em medula espinal.

- Aumentou hidroperóxidos lipídicos em tronco encefálico aos 6 e 18 meses, com redução desse parâmetro nessa região aos 24 meses; reduziu tióis totais em tronco encefálico aos 6 meses; diminuiu a capacidade antioxidante total em córtex cerebral aos 24 meses; e reduziu a atividade da enzima superóxido dismutase em cerebelo aos 6 e 18 meses, mas aumentou essa atividade em córtex cerebral aos 18 meses.

Em conjunto, os resultados seguiram na direção de efeito benéfico do exercício de baixa intensidade durante o envelhecimento, apesar de o estudo possuir limitações (número pequeno de ratos por grupo). Embora estudos complementares sejam necessários para melhor entendimento da relação entre exercício regular de baixa intensidade e variações em função locomotora e metabolismo oxidativo no SNC, os resultados do presente estudo reforçam o uso do exercício de baixa intensidade como estratégia para envelhecimento com qualidade de vida.

8- PERSPECTIVAS

Como perspectivas, propõe-se preparar grupos experimentais de ratos nas idades de 3 meses e 30 meses, sedentários e treinados, para morte por perfusão intracardíaca e posterior coleta do SNC para avaliação por técnicas histológicas. Destaca-se que os grupos de ratos nas idades de 6, 18 e 24 meses para esse estudo foram previamente preparados, e o SNC coletados.

Propõe-se ainda avaliar o padrão de distribuição da imunorreatividade ao receptor rianodina no SNC de ratos Wistar, machos, nas idades de 3, 6, 18, 24 e 30 meses, sedentários e treinados, avaliando especialmente o segmento lombossacral da medula espinal e as regiões do complexo nuclear vestibular, cerebelo e córtices cerebrais. O motivo desse estudo é que os receptores rianodina, proteínas transmembranais, atuam como canais de cálcio intracelulares em aves (OUYANGGET al., 1993), camundongos, coelhos e humanos jovens e adultos (ABU-OMAR et al., 2018).

Como os receptores rianodina tem sua atividade modulada por proteína transmembrana denominada presenilina, tipos 1 e 2, e óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*) do tipo neuronal (ABU-OMAR et al., 2018), pretende-se determinar o padrão de distribuição da imunorreatividade à proteína presenilina, tipo 1 e 2, e da reatividade a NADPH-diaforase, que é um marcador de atividade da NOS, nas mesmas regiões do SNC. Após, pretende-se determinar, por densitometria óptica, a intensidade das reações de imunoistoquímica e histoquímica. Posteriormente, será calculada a correlação entre os valores quantitativos obtidos por densitometria e os dos testes de equilíbrio e do passo, tanto para ratos sedentários como treinados.

Sugere-se ainda avaliar, por técnica histológica de Hematoxilina e Eosina, o aspecto das camadas da glândula suprarrenal, a fim de inferir situação de estresse aos ratos. Propõe-se ainda avaliar parâmetros metabólitos e histológicos nos tecidos de gordura branca e marrom, e parâmetros oxidativos em fígado, coração e rim, todas essas avaliações com o intuito de mostrar que os ratos do presente estudo envelheceram exibindo processos comumente encontrados durante o envelhecimento.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAMA, T. A. Falls in the elderly Spectrum and prevention. **Canadian Family Physician**, 2011. v.5, p.771-776.
- ABU-OMARI, N. *et al.* Neuronal Ryanodine Receptors in Development and Aging **MolNeurobiol**, 2018. v. 55, p.1183–1192.
- ADAMS, L.; Maria C FRANCO, M.C.; ESTEVEZ, A.G. Reactive nitrogen species in cellular signaling. **Experimental Biology and Medicine**, 2015. v. 240, p.711–717.
- AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, 2001. v. 302, p. 141–145.
- ALLEN, D. *et al.* Age-Related Vestibular Loss: Current Understanding and Future Research.Directions. **Frontiers in Neurology**,2016. v.7, n.231, p.1-6.
- ALLEN, M.D. *et al.* Differential age-related changes in bone geometry between the humerus and the femur in healthy men.**Aging and Disease**, 2012. v.3,p.156-163.
- ALMEIDA, M.; O'BRIEN, C.A. Basic Biology of Skeletal Aging: Role of Stress Response Pathways. **J Gerontol A Biol Sci. Med.**, 2013. v.68, n.10, p.1197-1208.
- ALVAREZ, J.C. *et al.* Aging and the human vestibular nuclei: morphometric analysis. **Mechanisms of Ageing and Development**, 2000. v. 114,p. 149-172.
- ALTUN, M. *et al.* Behavioral impairments of the aging rat. **Psychology & Behavior**.,2007. v.92, p.911-923.
- ANDREOLLO, N. A. *et al.* Rat's age versus human's age: what is the relationship? **Arq Bras Cir Dig**, 2012. v.25, p.49–51.
- ANNIKO, M. The aging vestibular hair cell. **Am J. Otolaryngol.**, 1983. v.4, p.151-160.
- ANSON, E.; JEKA, J. Perspectives on Aging vestibular Function. **Frontiers in Neurology**,2016. v.6, n.269, p. 1-7.
- ANTUNES, H. K. M. *et al.* Exercício físico e função cognitiva: uma revisão. **Rev Bras Med Esporte**, 2006. v. 12, n.2, p.108-114.
- ARAKRLIAN, V.M. *et al.* Physiological responses in different intensities of resistance exercise- Critical load and the effects of aging process.**Journal of Sports Sciences**, 2018. v. 37, n.12, p.1420-1428.
- BABIN, R. W.; HARKER, L. A. The vestibular system in the elderly. **Otolaryngologic clinics of North America**, 1982. v. 15, n. 2, p. 387-393.
- BAKER, J. *et al.* Exercise training differentially alters axial and appendicular marrow cellularity in old mice. **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, 2018. P.2-15.
- BALU, M. *et al.* Age-Related oxidative protein damage in central nervous system of rats: modulatory role of grape seed extract. **Int. J. Devl. Neuroscience**,2005. V. 23, p. 501-507.
- BALCERCZYK, A *et al.* Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity. **BioFactors**,2003. V.17, p.75-82.
- BARMACK, N. H. Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. **Brain Research Bulletin**, 2003.v.60, p.511-541.

- BECKHAUSER, T. F.; FRANCIS-OLIVEIRA, J.; PASQUALE, R. D. E. Reactive oxygen species: Physiological and physiopathological effects on synaptic plasticity. **Journal of Experimental Neuroscience**, 2016. p. 23–48.
- BERGSTRÖM, B. Morphology of the vestibular nerve: III. Analysis of the calibers of the myelinated vestibular nerve fibers in man at various ages. **Acta oto-laryngologica**, 1973, v. 76, n. 1-6, p. 331-338.
- BERNHARDI, R. Envejecimiento: Cambios bioquímicos y funcionales del Sistema Nervioso Central. **Rev Chil Neuro-Psiquiat** 2005. v.43, n. 4, p. 297-304.
- BITTNER, Combining lifestyle risks to disentangle brain structure and functional connectivity differences in older adults. **Nature Communications**, 2019. v. 10:, p.621.
- BLANTOM, C. Bone response to dietary co-enrichment with powdered whole grape and probiotics. **Nutrients**, 2018. v.10 p. E146.
- BLOOM, C.M.; ANCH, A.M.; DYCHE, J.S. Behavioral effects of chronic melatonin and pregnenolone injections in a myelin mutant rat (taiep). **J Gen Psychol** , 2002. v. 129, p. 226–237.
- BLUMENTHAL, James A. *et al.* Effects of exercise training on older patients with major depression. **Archives of internal medicine**, v. 159, n. 19, p. 2349-2356, 1999.
- BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, 2004.v. 125, p. 811-826.
- BOUDET, J.; ROULLET, J.B.; LACOUR, B. Influence of fast, body, weight and diet on serum cholesterol, triglycerides and phospholipids concentrations in the aging rat. **Horm. Metabol Res**, 1988. v.20, p.734-737.
- BOUSHEL *et al* Low-intensity training increases peak arm VO₂ by enhancing both convective and diffusive O₂ delivery
- BRAIDY, N *et al.* Mapping NAD⁺ metabolism in the brain of aging Wistar rats potential targets for influencing brain senescence. **Biogerontology**, 2014. v. 15, p.177-198.
- BROSEL, S. *et al.* Molecular aging of the mammalian vestibular system. **Ageing Research Reviews**, 2016.v.26, p.72–80.
- BROSEL, S.; STRUPP, M. The Vestibular System and Ageing. **Biochemistry and Cell Biology of Ageing**, 2019. p. 195- 225.
- BROWN, M.; TAYLOR, J.; GABRIEL, R. Differential Effectiveness of Low-Intensity Exercise in Young and Old Rats. **Journal of Gerontology: Biological Sciences**, 2003. n.10, p.889-894.
- BROWN, L.; *et al.* Late life maintenance and enhancement of functional exercise capacity in low and high responding rats after low intensity treadmill training. **Experimental Gerontology**, 2019. p.1-40.
- BRUIJN, S. M.; von DIEËN, J. H. Control of human gait stability through foot placement. **J.R. Soc. Interface**, 2018. v.15, n.24, p.1-11.
- CADENAS, E. DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical geration, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology & Medicine**, 2000. v. 29, n. 3/4, p. 222–230.
- CARDOSO, A.S. *et al.* The aging processo f the nervous system and possible influences from physical activities. **UEPG Biol. Healt.Sci.**, 2007.v.13, p.29-44.
- CARTER, J. R.; RAY, C. A. Sympathetic responses to vestibular activation in humans. **Am J. Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 2008. v. 294, p. R681-R688.

- CARRO, E. *et al.* Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. **Journal of Neuroscience**, 2001. v. 21, n. 15, p. 5678-5684.
- CASPERSEN, C.J.; POWELL, K.E.; CHRISTENSON, G.M. Physical Activity, Exercise, and Physical Fitness: Definitions and Distinctions for Health-Related Research. **Public Health Reports** 1985, v. 100, n.2, p.126-131.
- CASSAR, M. *et al.* Dopamine receptor contribute stoparaquat-induced neurotoxicity in drosophila. **Hum Mol Genet** , 2015. v.24, p.197–212.
- CIRCU, M.L. AW, T.Y. Reactive oxygen species cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology e Medicine**, 2010.p.1-14.
- CIVINSKI, C.; MONTIBELLER, A.; BRAZ, A. L.O.The importance of physical exercise in the aging. **Revista da Unifebe** (Online) 2011. p.163-175.
- CHAIMOWICZ, F. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. **Revista de Saúde Pública**, 1997. v.31, p.184-200.
- CHALIMONIUK,M. *et al.* Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats. **J Physiol Pharmacol**, 2015.v. 66, p.539-547.
- CHANG, H.C. *et al.* An 8-Week Low-Intensity Progressive Cycling Training Improves Motor Functions in Patients with Early-Stage Parkinson’s Disease. **J Clin Neurol**, 2018. v.14, n.2, p.225-233.
- CHODZKO-ZAJKO *et al.* Exercise and Physical activity for older adults.**Journal of the American College of Sports Medicine**, 2009.p.1510-1530.
- CHURCHILL, *et al.* Exercise, experience and the aging brain. **Neurobiology of Aging**, 2002.v.23, p. 941–955.
- COLCOMBE, S.J. *et al.* Aerobic Exercise Training Increases Brain Volume in Aging Humans. **Journal of Gerontology: Medical Science**, 2006. v. 61A, n. 11, p.1166–1170
- COLCOMBE, S.J. *et al.* Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. **PNAS** ,2004. v.101, n. 9, p. 3316–3321.
- COLCOMBE, Stanley; KRAMER, Arthur F. Fitness effects on the cognitive function of older adults: a meta-analytic study. **Psychological science**, v. 14, n. 2, p. 125-130, 2003.
- COTMAN, Carl W.; BERCHTOLD, Nicole C. Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 6, p. 295-301, 2002.
- CULLEN, K. E. The vestibular system: multimodal integration and encoding of self-motion for motor control. **Trends in Neuroscience**,2012. v.35, n.3, p. 185-196.
- CUNNINGHAM, H. *et al.* Age-related bone loss and recovery during hindlimb unloading and subsequent reloading in rats.**BMC Musculo skeletal Disorders**, 2018. V.19,n.223, p.1-11.
- CRUZAT, V.F. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação **Rev. Bras Med Esporte**, 2007.v.13, n.5, p. 336-342.
- De MEDINACELI,L.; FREED, W.J.; WYATT,R.J. An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. **Experimental Neurology**, 1982.v.77,p.634-643
- De SOUZA, R.F. *et al.* Endurance training on rodent brain antioxidant capacity: A meta-analysis. **Neuroscience Res.**,2018.p.1-9.

- DEVI, S.A. Aging brain: Prevention of oxidative stress by vitamin E and exercise. **The scientific world Journal**, 2009.v.9, p. 366-372.
- DING, Y. *et al.* Functional improvement after motor training is correlated with synaptic plasticity in rat thalamus. **Neurological Research**, 2002. v. 24, p.829-836.
- DOMAZETOVIC, V. *et al.* Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, 2017. v.14, n.2, p.209-216.
- DRÖGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol Rev**, 2002.v. 82: p.47–95.
- EATON, P., 2006. Protein thiol oxidation in health and disease: techniques for measuring disulfides and related modifications in complex protein mixtures. **Free Radical Biology and Medicine**, 2006. v.40, n.11, p.1889-1899.
- ELSNER, V. R. *et al.* Exercise induces age-independent changes on epigenetic parameters in rat hippocampus: A preliminary study. **Experimental Gerontology**, 2013.v.48, p.136-139.
- ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M.N. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. **Revista Contexto & Saúde**. Ijuí, 2011. v.10,n.20, p.93-102.
- EREL O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clin Biochem**,2004. v.37, p. 277–285.
- ESQUINAZI, D.; SILVA, S.R.B.; GUIMARÃES, M.A.M. Aspectos fisiopatológicos do envelhecimento humano e quedas em idosos. **HUPE**. Rio de Janeiro,2014. v. 13,.2,p. 11-20.
- ESIRI, M.M. Ageing and the brain. **Journal of Pathology**, 2007.v.211, p.181–187.
- EVANS, W.J. Exercise, nutrition and aging. **The Journal of Nutrition**, 1992. p. 796-801.
- FALCK, R.S. *et al.* Impact of exercise training on physical and cognitive function among older adults: a systematic review and meta-analysis. **Neurobiology of Aging**, 2019.p.1-45.
- FALSARELLA, G.R. *et al.* Influence of muscle mass and bone mass on the mobility of elderly women: an observational study. **BMC geriatrics**, 2014. v. 14, n.1, p.13.
- FENG, X.; YUAN, W. Dexamethasone enhanced functional recovery after sciatic nerve crush injury in rats. **Bio Med Research International**, 2015. p.1-9.
- FENGER, C.K. *et al.* Generalized medullary infarction of the long bones in a horse. **J Am Vet Med Assoc**, 1993. v. 202, p. 621-623.
- FERNÁNDEZ, J. A. *et al.* Aging in the vestibular nuclear complex of the male Golden hamster (*Mesocricetus auratus*): anatomic and morphometric study. **Histo Histopathol.**, 2007. v.22, p.855-868.
- FHON, J. R. S. *et al.* Queda e sua associação à síndrome da fragilidade no idoso: revisão sistemática com metanálise. **Rev Esc Enferm USP** · 2016. v.50, n.6, p.1005-1013.
- FOLKINS, C.H.; SIME, W.E. Physical fitness training and mental health. **Am Psychol**. 1981. v.36, n.4, p.373-89.
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: A radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, 1998. v. 201, p.1203-1209.
- GANT, J.C. *et al.* FK506-binding protein 1b/12.6: A key to aging-related hippocampal Ca²⁺ dysregulation? **Eur J Pharmacol**, 2014. v.739, p.74–82.
- GARG, G. N-acetyl L-cysteine attenuates oxidative damage and neurodegeneration in rat brain during aging. **Can. J. Physiol. Pharmacol**, 2018. p.1-26.
- GARCIA-MESA, Y. *et al.* Oxidative stress is a central target for physical exercise neuroprotection against pathological brain aging. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med.**, 2016. v.71, n.1, p.40-49.

- GAZZOLA, J.M. *et al.* Aging and the vestibular system. **Fisioterapia em Movimento**. Curitiba, 2005. v.18, n.3, p.39-48.
- GELL,N.M.; PATEL, K.V. Rehabilitation Services Use of Older Adults According to Fall-Risk Screening Guidelines. **JAGS**, 2019.v.67, p.100-107.
- GERARDS, M.H.G. *et al.* Perturbation-based balance training for falls reduction among older adults: Current evidence and implications for clinical practice. **Geriatr Geronto Int** ,2017. p.1-10.
- GHEZZI, A.C. *et al.* Metabolic syndrome markers in Wistar rats of different ages. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, 2012, v.4,n.16,p.1-7.
- GÓRSKA, P. Principles in laboratory animal research for experimental purposes. **Med. Sci. Monit.**, 2000. v.6, n.1, p. 171-180.
- GRACE, P. M. *et al.* Nitroxidative Signaling Mechanisms in Pathological Pain. **Trends in Neurosciences**, 2016. v. 39, n. 12, p. 862–879.
- GRANACHER, U. The Importance of Trunk Muscle Strength for Balance, Functional Performance, and Fall Prevention in Seniors: A Systematic **Review**. **Sports Med**,2013. v.43, p.627–641.
- GRILL, J. D.; RIDDLE, D.R. Age-related and laminar-specific dendritic changes in the medial frontal cortex of the rat. **Brain Research**, 2002. v. 937, p.8–21
- GUPTA, A. *et al.* Age-related elevation of lipid peroxidation products: Diminution of superoxide dismutase activity in the central nervous system of rats. **Gerontology**,1991. v.37, p.305-309.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. New York: Oxford University Press, 2007.
- HALLIWELL, B.;GUTTERIDGE, J.M., 2015. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, USA.
- HARMAN, D. Aging: Overview. **Annals New York Academy of Science**, 1981. p.1-21.
- HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mutation Research**, 1992. v. 275, p.257-266.
- HAYES, C.; KRISKA, A. Role of physical activity in diabetes management and prevention.**Journal American Dietetic Association**, 2008.v.108, n.4, p.s19-s23.
- HIDA, T. *et al.* Managing Sarcopenia and Its Related-Fractures to Improve Quality of Life in Geriatric Populations. **Ageing and Disease**, 2014. v. 5, n.4, p.226-237.
- HIM, A.*et al.* Glutamate responsiveness of medial vestibular nucleus neurons.**Brain Research Bulletin**, 2010.v.81, p.81-84.
- HITIER, M.; BESNARD, S.; SMITH, P.F. Vestibular pathways involved cognition. **Frontiers in Integrative Neuroscience**. 2014.v.8, n.59, p.16.
- HUANG, Y. *et al.* Physical fitness, physical activity, and functional limitation in adults aged 40 and older. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 30, n. 9, p. 1430-1435, 1998.
- HUSSAIN, S.; SLIKKER, W.Jr.; ALI, S.F. Age-Related changes in antioxidant enzymes. superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. **Int J Dev Neurosci**,1995. v. 13,p. 811-817.
- IIDA,H.; FUKUDA, S. Age-related changes in bone mineral density, cross-sectional area and strength at different skeletal sites in male rats. **J. Vet. Med. Sci.**, 2002. V.64,n.1,p.29-34.
- JACKSON, M.; MCARDLE, A. Role of reactive oxygen species in age-related neuromuscular deficits. **J Physiol**, 2016. v.594,n. 8, p. 1979–1988.
- JADLAO, A. G. *et al.* The distribution of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADPH-d) in the medulla oblongata, spinal cord, cranial and spinal nerves of frog, *Microhyla ornata*. **J Chem Neuroanat** 2017; v.81,p.76-86.

- JAHN, K.; ZWERGAL, A.; SCHNIEPP, R. Gait disturbances in old age. Classification, diagnosis and treatment. From a Neurological Perspective. **Dtsch Arztebl Int**, 2010. v.107, n.17, p.306-316.
- JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe+2 in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, 1991. v. 26, p. 853–856.
- Jl, L.L. Exercise-induced Modulation of Antioxidant Defense. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 2002. v. 959, p. 82–92.
- Jl, L.; Zhai, S. Aging and the peripheral vestibular system. **Journal of Otology** , 2018. v.13, p.138–140
- JOLITHA, A.B.; SUBRAMANYAM, M.V.; DEVI, A.S. Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: Studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status. **Exp Gerontol**, 2006. v.41, p.753–763.
- JOVÉ, M. *et al.* Lipids and lipoxidation in human brain aging. Mitochondrial ATP-synthase as a key lipoxidation target. **Redox Biology**, 2018. v. 19, p. 1-14.
- KALACHE, A. The world is ageing: a pact of social solidarity is an imperative. **Ciências & Saúde Coletiva**, 2008. v.13, n.4, p.1107-1111.
- KALLENBORN-GERHARDT, W. *et al.* NOXious signaling in pain processing. **Pharmacology and Therapeutics**, 2013. v. 137, n. 3, p. 309–317.
- KARA-JOSÉ, N.; BICAS, H.E.; CARVALHO, R.S. Cirurgia de catarata: necessidade social. **C&D - Editora e Gráfica**; 2008. São Paulo. p. 45-6.
- KELLIHER, M. *et al.* Alterations in the ryanodine receptor calcium release channel correlate with Alzheimer's disease neurofibrillary and β amyloid pathologies.
- KHALSA, D.S. Integrated medicine and the prevention and reversal of memory loss. **Alternative therapies in Health and Medicine**, 1998. v. 4, n. 6, p. 38.
- KIM, Y. J.; BYUN, J. H.; CHOI, I. S. Effect of exercise on μ -opioid receptor expression in the rostral ventromedial medulla in neuropathic pain rat model. **Annals of rehabilitation medicine**, 2015. v.39, n.3, p. 331.
- KIM, H.K. *et al.* Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, 2004. v. 111, n. 1-2, p. 116-124. **Neuroscience**, 1999. v. 9, p.499–513.
- KLEIM, Jeffrey A.; JONES, Theresa A.; SCHALLERT, Timothy. Motor enrichment and the induction of plasticity before or after brain injury. **Neurochemical research**, v. 28, n. 11, p. 1757-1769, 2003.
- KLEINER, A. F. R.; SCHLITTER, D. C.; SÀNCHEZ-ARIAS, M. D. R. O papel dos sistemas visual, vestibular, somatossensorial e auditivo para o controle postural. **Rev. Neuroscience**, 2011. v. 19, n.2, p.349-357.
- KOVRT, W.M.; OBERT, K.A.; HOLLOSZY, J. O. Exercise training improves fat distribution patterns 60- to 70 year-old men and women. **J. Gerontol.**, 1992. v.47, n.4, p. M99-105.
- KRATZ, D.B.; SILVA, G.S. TENFEN, A. Deficiência de vitamina D (25OH) e seu impacto na qualidade de vida: uma revisão de literatura. **RBAC**, 2018. v. 50, n. 2, p.118-123.
- KRAMER, A.F. *et al.* Ageing, fitness and neurocognitive function. **Nature**, 1999. v.400, p.418-419.
- KRAMER, A. F. *et al.* Fitness, aging and neurocognitive function. **Neurobiology of Aging**, 2005. v. 26s, p. s124-s127.

- KRAMER, A.F.; ERICKSON, K, I.; COLCOMBE, S, J. Exercise, cognition, and the aging brain. **J Appl Physiol**, 2006. v.101, p.1237-1242.
- KRAUSE NETO, W. *et al.* Aging induces changes in the somatic nerve and postsynaptic component without any alterations in skeletal muscles morphology and capacity to carry load of wistar rats. **Frontiers in Neuroscience**, 2017.v.11,n.688,p.1-7.
- KRISHMAN, V.S. *et al.* A neurogenic perspective of sarcopenia: Time course study of sciatic nerves from aging mice. **J Neuroipathol Exp Neurol**, 2016. V.75,n.5, p.464-478.
- KRONENBERG, G. *et al.* Physical exercise prevents age- related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. **Neurobiology of Aging**, 2006. v.27, p. 1505-1513.
- KRUK, J. *et al.* Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions:the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. **Free Radical Research**, 2019.
- LAURITZEN, Jes Bruun; MCNAIR, P. A.; LUND, B. Risk factors for hip fractures. A review. **Danish medical bulletin**, v. 40, n. 4, p. 479-485, 1993.
- LEE, S. W.; CLEMENSON JR, G. D.; GAGE, F. H. New neurons in an aged brain.Behav.**Brain Res**. 2012. v.14, n.2, p.497-507.
- LEXELL, J. Evidence for nervous system: Degeneration with advancing age. **The Journal of Nutrition**, 1997.v.127, p. 1011s-1013s.
- LIMA, A. P. *et al.* Alterações fisiológicas advindas da prática da atividade física no processo de envelhecimento para a melhoria da qualidade de vida. **EFDesportes**.Buenos Aires.2011. n.153,p.1-12.
- LIOCHEV, S. I. Reative Oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, 2013. v.60,p.1-4
- LÓPEZ-LÓPEZ, J. *et al.* Radiolucent periapical lesions and boné mineral density in post-menopausal women. **Gerontology**, 2013.P.1-7.
- LOPEZ, Ivan; HONRUBIA, Vicente; BALOH, Robert W. Aging and the human vestibular nucleus. **Journal of Vestibular Research**, v. 7, n. 1, p. 77-85, 1997.
- LOVATEL, G. A. *et al.* Long-term effects of pre and post-ischemic exercise following global cerebral ischemia on astrocyte and microglia functions in hippocampus from Wistar rats.**Brain Research**, 2014.v.1587, p.119-126.
- LOWRY OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**. 1951. v.193, n.1, p.265-75.
- MARCHI-NETO, F. L. Aspectos biológicos e Fisiológicos do Envelhecimnto Humano e suas implicações na saúde do Idoso. **Pensar a Prática**, 2004. v.7, p. 75-84.
- MAZZEO, R.S.;HIROFUMI, T. Exercise Prescription for the Elderly.**Sports Med**, 2001. v. 31, n.11, p.809-818.
- MATSUDO, S.M. *et al.* Impacto do envelhecimento nas variáveis antropométricas, neuromotoras e metabólicas da aptidão física.**Rev. Bras. Ciên. E Mov.**, 2000. v.8,n.4, p.21-32.
- MATSUDO, S. M.; MATSUDO, V. K. R.; BARROS nETO, T. L. Atividade Física e envelhecimento:aspectos epidemiológicos. **Rev. Bras. Med. Esporte**, 2001. v. 7, n. 1.
- MATTSON, Mark P. Neuroprotective signaling and the aging brain: take away my food and let me run. **Brain research**, v. 886, n. 1-2, p. 47-53, 2000.
- MATTSON, M. P.;CHAN, S. L. DUAN, W. Modification of brain aging and neurodegenerative disorders by genes, diet and behavior.**Physiol. Rev.**, 2002. v.82, p. 637-672.
- MCPhillips,J. B. *et al.* Exercise Patterns in a Population of Older Adults. **Am J Prev. Med.**, 1989. v.5, n.2, p. 65-72.

- MEES, L. M. *et al.* Low-Intensity Exercise in Mice Is Sufficient to Protect Retinal Function During Light-Induced Retinal Degeneration. **IOVS**,2019. v.60, n.5, p.1329.
- MEYER, T. *et al.* Effectiveness of Low-Intensity Endurance Training. **Int J Sports Med**, 2007. v. 28, p.33–39.
- MELO, K.P. *et al.* Mild exercise differently affects proteostasis and oxidative stress on motor areas during neurodegeneration: A comparative study of three treadmill running protocols. **Neurotoxicity Research**, 2018. p. 1-11.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J BiolChem**,1972. v. 247, p. 3170–3175.
- MIRANDA, G. M. D.; MENDES, A. C. G.; SILVA, A. L. A. O envelhecimento populacional brasileiro: desafios e consequências sociais atuais e futuras. **Rev Bras Geriatr Gerontol**, Rio de Janeiro, 2016. v.19, n.3, p.507-519.
- MIZUNO, Y.; Ohta, K. Regional distributions of thiobarbituric acid-reactive products, activities of enzymes regulating the metabolism of oxygen free radicals, and some of the related enzymes in adults and age rat brain. **Journal of Neurochemistry**, 1986. v.46,n.5,p.1344-1352.
- MORA, F.; SERGOVIA, G.; del ARCO, A. Aging, plasticity and environmental enrichment: Structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. **Brain Research Review**, 2007.v. 55.p. 78-88.
- MORLEY, J.E. *et al.* Sarcopenia with limited mobility: An International Consensus. **J Am Med Dir Assoc**, 2011. v.12.p.403-409.
- MOYSE, E. *et al.* Brain region-specific effects of long-term caloric restriction on redox balance on the aging rat. **Mechanisms of Ageing and Development**,2019. v.179,p.51-59.
- MUSIENKO, P. *et al.* Somatosensory control of balance during locomotion in decerebrated cat. **J. Neurophysiol**, 2012. v.107,p.2072-2082.
- NADOL JR. J. B.; SCHUKNECHT, H.F. Pathology of peripheral vestibular disorders in the elderly. **Am J. Otolaryngol**, 1990. v.11, p. 213-227.
- NASRI, F. The aging population in Brazil. **Einstein**, 2008. v. 6, p. S4-S6.
- NAVARRO, A; BOVERIS, A. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 2004. v. 287, p. R1244–R1249.
- NEUMANN, L.T.V.; ALBERT, S.M. Aging in Brazil. **Gerontologist**, 2018. v. 58, p. 611-617.
- NELSON, M. T. *et al.* Molecular Mechanisms of Subtype-Specific Inhibition of Neuronal T-Type Calcium Channels by Ascorbate. **Journal of Neuroscience**, 14 nov.2007 . v. 27, n.46, p.12577–12583.
- NOHL, H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. **British medical bulletin**, 1993.v. 49, n. 3, p. 653-667.
- OUYANG, Y. *et al.* Distribution of ryanodine receptors in the chicken central nervous system. **Brain Research**, 1993.v.620, p. 269-280.
- PADOIN, P.G. *et al.* Análise comparativa entre idosos praticantes de exercício físico e sedentários quanto ao risco de quedas. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, 2010. v. 34, n.2, 158-164.
- PANNESE, E. Morphological changes in nerve cells during normal aging. **Brain Struct.Funct.**, 2011. v. 216, p.85-89.

- PANNÉREC, A. *et al.* A robust neuromuscular system protects rat and human skeletal muscle from sarcopenia. **Aging**, 2016. V.8,n.4,p.712-728.
- PANDYA, J. D. *et al.* Age and brain region-specific differences in mitochondrial bioenergetics in Brown Norway rats. **Neurobiology of Aging**, 2016. v.42,p.25-34.
- PARTADIREDDA, G. *et al.* The effects of light and moderate intensity exercise on the femoral bone and cerebellum of D- galactose exposed rats. **Rejuvenation Research**,2019. v.22, n.1, p.20-30.
- PARTATA W, *et al.* Distribution of glycogen phosphorylase and cytochrome oxidase in the central nervous system of the turtle *Trachemys dorbigni*. **Comp BiochemPhysiol A Mol Integr Physiol** , 1999. 124:113–122.
- PARKINSON, G.M.; DAYAS, C.V.; SMITH, D.W. Perturbed cholesterol homeostasis in aging spinal cord. **Neurobiology of Aging**,2016. v.45,p.123-135.
- PATEL, R.; SESTI, F. Oxidation of ion channels in the aging nervous system. **Brain Research**, 2016.v.1639, p.174-185.
- PATERSON, D. H.; JONES, G.R.; RICE, C.L. Ageing and physical activity: evidence to develop exercise recommendations for older adults. **App Physiol Nutr Metab**. 2007. v.32, p.s69-s108.
- PAYNE, A. J. *et al.* Presenilins regulate the cellular activity of ryanodine receptors differentially through isotype-specific N-terminal cysteines. **Exp. Neurol**, 2013. p. 1-20.
- PETROSILLO, G. *et al.* Decline in cytochrome e oxidase activity in rat-brain mitochondria with aging. Role of peroxidizedcardiolipin and beneficial effect of melatonin. **J. Bioenerg. Biomembr.**,2013. v.45, p.431-440.
- PIETRELLI, A. Aerobic exercise prevents age-dependent cognitive decline and reduces anxiety-related behaviors in middle-aged old rats. **Neuroscience**, 2012. v. 202, p. 252–266.
- PICÓN-PAGÈS, P.; GARCIA-BUENDIA, J.; MUNOZ, F.J. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain.**BBA Molecular Basis of Disease** , 2019. v.1865, p.1949-1967.
- PICK, E.; KEISARI, Y.A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture.**J Immunol Methods**, 1980.v.38, p.161–170.
- PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2015. v. 97, p. 55-e74.
- PIZZINO, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017. p.1-13.
- PRASAD,S. N.; MURALIDHARA. Protective effects of geraniol (a monoterpene) in a diabetic neuropathy rat model: attenuation of behavioral impairments and biochemical perturbations. **J Neurosci Res**, 2014.v.92, p.1205–1216.
- PRAKASH, M. *et al.* Total thiols: Biomedical importance and their alteration in various disorders. **OJHAS.**, 2009. V.8, n.2, p.1-9.
- POLJSKAK, B.; SUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2013.p.1-11.
- POLLOCK, M.L. *et al.* Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease. **Benefits, rationate, safety and prescription**.2000.v.101, p.828-833.
- RAJAGOPAL, S. *et al.* Aging is associated with dimerization and inactivation of the brain-enriched tyrosine phosphatase STEP. **Neurobiology of Aging**, 2016.v.41, p.25-38.
- QI, Y. *et al.* Neuroprotective effect of dioscin on the aging brain.**Molecules**, 2019 v.24, p. E1247

- RADAK, Z. *et al.* Oxygen consumption and usage during physical exercise: The balance between oxidative stress and ROS- dependent adaptive signaling. **Antioxidants & Redox signaling**, 2013. V.18,n.10,p.1208-1246.
- RADAK, Z.; H.Y.; GOTO, S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radical Biology & Medicine**, 2008. v. 44, p.153-159.
- RADAK, Z. *et al.* Exercise effects on physiological function during aging. **Free Radical Biology and Medicine**, 2019.v.132, p.33–41.
- RAUCH,S.D. *et al.* Decreasing Hair Cell Counts in Aging Humans. **Annals New York Academy of Science**, 2001. p.220-227.
- REAL,C.C. *et al.* Different protocols of treadmill exercise induce distinct neuroplastic effects in rat brain motor areas. **Brain Research**. 2015. v. 1 6 2 4,p.188–198.
- RIBEIRO, J.L.; OLIVEIRA, A.R. Efeitos do exercício e do treinamento físico na hemostasia. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia= Brazilian journal of hematology and hemotherapy**. São Paulo.2005. v. 27, n. 3, p. 213-219.
- RIMER, J.H. Exercise and physical activity in persons aging with a physical disability. **Phys Med RehabilClin N Am.**, 2005.v.16, p.41-56.
- ROH, H. T. *et al.* Effect of Exercise Intensity on Neurotrophic Factors and Blood–Brain Barrier Permeability Induced by Oxidative-Nitrosative Stress in Male College Students . **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, 2016.
- ROND-REIG, L. *et al.* Role the interior olivary complex in motor skills and motor learning in the adult rat. **Neuroscience**, 1997.V.77, p.955-963.
- ROSA, E. F. *et al.* Habitual exercise program protects murine intestinal, skeletal, and cardiac muscles against aging. **J ApplPhysiol** , 2005. v.99, p.1569–1575.
- ROSENHALL, U. Degenerative patterns in the aging human vestibular neuro-epithelia. **Acta oto-laryngologica**, v. 76, n. 1-6, p. 208-220, 1973.
- RUWER, S.L.; ROSSI, A.G.; SIMON, L. F. Equilíbrio no Idoso. **Rev. Bras. Otorrinolaringol**, 2005. v.71, n.3, p. 298-303.
- SAHIN, A. *et al.* Comparison of serum oxidant and antioxidant parameters in familial Mediterranean fever patients with attack free period. **ActaReumatol Port**, 2014. v. 39, p.316–321
- SALMON, A. B.; RICHARDSON,A.; PÉRE, V. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging. **Free RadicBiol Med**,2010.v. 48, n.5, p.642.
- SASAKI, J.E.; SANTOS, M.G. O papel do exercício aeróbico sobre a função endotelial e sobre os fatores de risco cardiovascular. **Arq.Bras.Cardiol**, 2006.v.87, p. e227-e233.
- SCOPEL, D. *et al.* Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. **Brain Research Bulletin**, 2006.v.71, p.155-159.
- SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. São Paulo, BR., 2004. v.10, n. 4, p. 308-313.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **American Journal of Medicine**, 1991. p. 31-38.
- SINGULANI, M.P. *et al.* Effects of strength training on osteogenic differentiation and bone strength in aging female Wistar rats. **Sci Rep**, 2017. V.7,p.428-478.
- SINGH, M.A. Exercise and aging. **Clin.Geriatr.Med.**, 2004.v.20, p. 201-221.

- SINGH, M. A. Exercise to prevent and treat functional disability. **ClinGeriatr. Med.**, 2002. v.18, p.431-462.
- SILVA, N.L. *et al.* Exercício físico e envelhecimento: benefícios à saúde e características de programas desenvolvidos pelo LABSAU/IEFD/UERJ. **HUPE**, Rio de Janeiro, 2014. v.13, n.2, p.75-85.
- SIM, Y.J. *et al.* Long-term treadmill exercise overcomes ischemia-induced apoptotic neuronal cell death in gerbils. **PhysiolBehav**, 2005. v. 84. p. 733–738.
- SILVEIRA, E. M. S. *et al.* Age-related changes and effects of regular low-intensity exercise on gait, balance, and oxidative biomarkers in the spinal cord of Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 7, 2019.
- SLOANE, P.D.; BALOH, R.W.; HONRUBIA, V. The Vestibular System in the Elderly: Clinical Implications. **Am J Otolayngol**, 1989.v.10, p.422-429.
- SMITH, P.F. Age-related neurochemical changes in the vestibular nuclei. **Frontiers in Neurology**, 2016.v.7,n.20,p.1-9.
- STEFANATOS, R.; SANZ, A. The role of mitochondrial ROS in the aging brain. **FEBS Letters**, 2018. V.592, p.743-758.
- SCHEBER, M.; CHANDEL, N.S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Current Biology**, 2014.v.24, p. R453-R462.
- SCHARFMAN, H. *et al.* Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Experimental Neurobiology*, 2005. v. 192. P. 348-356.
- SCHWARZ, E.C.; THOMPSON, J.M. The Effects of Aging on Hypoglossal Motoneurons in Rats. **Dysphagia**, 2009.v.24, p.40-48.
- SCHEID, T. *et al.* Effects of Methanol Fraction from Leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi on Nociception and Spinal-Cord Oxidative Biomarkers in Rats with Neuropathic Pain. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018. P.1-11.
- SHANKAR, Susarla K. *et al.* Biology of aging brain. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 595, 2010.
- SHWE, T. *et al.* Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions. **Experimental Gerontology**, 2018. v. 101, p.13-36.
- SOMANI, S.M.; RAVI, R.; RYBAK, L.P. Effect of exercise training on antioxidant system in brain regions of rat. **PharmacolBiochemBehav**, 1995. V. 50, p.635-639.
- SOUZA, M.S.B. *et al.* Antioxidant extract counteracts the effects of aging on cortical spreading depression and oxidative stress in the brain cortex. **Acta Cir. Bras.**, 2018. V.33,n.6,p.472-482.
- SÖDERGREN, E. *et al.* Reevaluation of the ferrous oxidation in xylenol orange assay for the measurement of plasma lipid hydroperoxides. **J. Biochem. Biophys. Methods**, 1996. v.37. p. 137-146.
- TANG, Y.; LOPEZ, I. BALOH, R.W. Age-related change of the neuronal number in the human medial vestibular nucleus: A stereological investigation. **Journal of vestibular Research**. 2002. v. 11, p.357-363.
- TASCIOGLU, A. B. Brief review of vestibular system anatomy and its higher order projections. **Neuroanatomy**, 2005. p. 24-27.
- TASKIRAN, D. *et al.* Sex differences in nitrite/nitrate levels and antioxidant defense in rat brain. **Neuroreport**. 1997. V. 8, p.881-884.

- TROMM, C.B. *et al.* Effect of different frequencies weekly training on parameters of oxidative stress. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, 2012. v.14, n.1, p.52-60.
- TUNG, V.W. *et al.* Behavioral assessment of the aging mouse vestibular system. **J Vis Exp**, 2014. v. 89, p. e51605.
- UGRENOVIC, S. *et al.* Morphometric analysis of the diameter and g-ratio of the myelinated nerve fibers of the human sciatic nerve during the aging process. **Ana Sci Int.**, 2016. V.91, p.238-245
- UNGAR, A. Fall prevention in the elderly. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, 2013. v. 10, n.2, p. 91-95.
- VALERA *et al.* How to Undertake Aging in a Healthy Way: Changes and Opportunities **Aquichan**, 2019. v. 19, n.1, p. e1915.
- VAN PRAAG, H. *et al.* Exercise Enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. **The Journal of Neuroscience**, 2005. v.25, n.38, p. 8680-8685.
- VANZELLA, C. *et al.* Treadmill running prevents age-related memory deficit and alters neurotrophic factors and oxidative damage in the hippocampus of Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, 2017. v.334, p.78–85.
- VÀZQUEZ. J.O. *et al.* El envejecimiento: Una mirada a la transición demográfica y sus implicaciones para el cuidado de la salud. **Rev. Enferm. Inst. Mex. Seguro Soc.**, 2018. v.26, n.4, p.273-280.
- VERGHESE, J.; AYERS, E. Biology of falls: preliminary cohort study suggesting a possible role for oxidative stress. **J Am Geriatr Soc.**, 2017. v.65, n.6, p.1306–1309.
- VILELA, T.C. *et al.* Aerobic and strength training induce changes in oxidative stress parameters and elicit modifications of various cellular components in skeletal muscle of aged rats. **Experimental Gerontology**, 2018. v. 106, p. 21–27.
- VILLAREAL, J.S. *et al.* Water maze training in aged rats: effects on brain metabolic capacity and behavior. **Brain Research**, 2002. v.939, p.43-51.
- VINÁ, J. *et al.* The free radical theory of aging revisited: the cell signaling disruption theory of aging. **Antioxid Redox Signal**, 2013. v.19, p.779–787.
- VIGNAUX, G. *et al.* The vestibular system: A newly identified regulator of bone homeostasis acting through the sympathetic nervous system. **Curr. Osteoporos Rep.**, 2015. v.13, p.198-205.
- VIRGILI, M. *et al.* Topography of neurochemical alterations in the CNS of aged rats. **Int. J. Devl. Neuroscience**, 2001. V.19, p.109-116.
- VON BERNHARDI, M. R. Envejecimiento: Cambios bioquímicos y funcionales Del sistema nervioso central. **Rev. Chil. Neuro-Psiquiat.**, 2005. v.43, n.4, p. 297-304.
- VON LEDEN, R. E. *et al.* Age exacerbates microglial activation, oxidative stress, inflammatory and NOX2 gene expression, and delays functional recovery in a middle-age rodent model of spinal cord injury. **Journal of Neuroinflammation**, 2017. v.14, n.161, p.1-14.
- WANG, H.D. Superoxide anion from the adventitia of the rat thoracic aorta inactivates nitric oxide. **Circulation Research**, 1998. v.82, p.810-818.
- WICKENS, A.P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, 2001. v.128, p.379-391.
- WHO global report on falls prevention in older age., 2007.
- WINTERBOURN, C.C. Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? **Free Radical Biology and Medicine**, 2015. v.80, p. 164-170.

- YEOMAN, M. *et al* .Insights into CNS ageing from animal models of senescence. **Nature Reviews**, 2012.v.13, p.1-11.
- YONUTAS, H.M.; PANDYA, J.D.; SULLIVAN, P.G. Changes in mitochondrial bioenergetics in the brain versus spinal cord become more apparent with age. **J. Bioenerg. Biomembr**, 2015. V.47, n.0,p.149-154.
- ZHANG, X. *et al*. Age- and gender- related metabonomic alterations in striatum and cerebellar cortex in rats. **Braint Research**, 2013. v. 1507, p.28-34.
- ZOPP, C.C. *et al*. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva.**Rev. paul. Educ. Fís.**, 2003. v. 17, n. 2, p. 119-30.

ANEXO I



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRO-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais

**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 29386

Título:

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXERCÍCIO FÍSICO DE BAIXA INTENSIDADE EM ESTEIRA SOBRE PARÂMETROS DA MARCHA E EQUILÍBRIO, MORFOMETRIA NEURONAL E NUCLEAR, E IMUNOISTOQUÍMICA A AMINAS NO COMPLEXO NUCLEAR VESTIBU

Vigência: 01/07/2015 à 30/12/2018

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

WANIA APARECIDA PARTATA - coordenador desde 01/07/2015

ELZA MARIA SANTOS DA SILVEIRA - Aluno de Doutorado desde 01/07/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 31/08/2015 - Sala 323 - Prédio do Anexo I da Reitoria - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 83 ratos Wistar com 3 meses de idade, originários do CREAL/UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 10 de Setembro de 2015

CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética

ANEXO II

Fwd: BJMBR - 9237 is now in your Admin Center

De: Wania Aparecida Partata (partataw@gmail.com) Para: elzamss@yahoo.com.br Data: terça-feira, 13 de agosto de 2019 19:56 BRT

----- Forwarded message -----De: Journal Office <onbehalf@manuscriptcentral.com>
Date: seg, 12 de ago de 2019 às 18:24 Subject: BJMBR - 9237 is now in your Admin Center To:
partataw@gmail.com

The Brazilian Journal of Medical and Biological Research is an OPEN-ACCESS journal. Articles published in the BJMBR are available only online in pdf. *****

Dear Dr. Dr. Partata,

On 12-Aug-2019, your manuscript entitled "Aging and low-intensity exercise changes oxidative biomarkers in brain regions and radiographic measures of femur of Wistar rats" by Silveira, Elza; Santos, Maria do Carmo; da Silva, Thaisla; Silva, Francielle ; Machado, Clivia; Elias, Lais; Kolberg, Angela; Kroth, Adarly; Partata, Wania was received. Your manuscript has been assigned the number: 9237.

You may check on the status of this manuscript by selecting the "Author Center" link under the following URL: <https://mc04.manuscriptcentral.com/bjmbr-scielo> (Press/Click on the above link to be automatically sent to the web page.)

Thank you for submitting your paper to the Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Sincerely yours,

Journal Office Brazilian Journal of Medical and Biological Research