



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE BIOCIECIAS

INSTITUTO KEIZO ASAMI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

DÉBORA EDUARDA DA SILVA FIDELIS NÓBREGA

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE O BALANÇO
OXIDATIVO HEPÁTICO-MUSCULAR E RESPOSTA INFLAMATÓRIA SÉRICA
EM CAMUNDONGOS FÊMEAS**

Recife

2025

DÉBORA EDUARDA DA SILVA FIDELIS NÓBREGA

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE O BALANÇO
OXIDATIVO HEPÁTICO-MUSCULAR E RESPOSTA INFLAMATÓRIA SÉRICA
EM CAMUNDONGOS FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Biologia aplicada à Saúde, Centro de biociências da
Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para
obtenção do título de mestre em Biologia aplicada à Saúde.

Área de Concentração: Biologia Aplicada à Saúde

Orientador: Prof^o. Dr. Fabrício Oliveira Souto

Coorientador: Prof^o. Dr. Matheus Santos de Sousa Fernandes

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Nóbrega, Débora Eduarda da Silva Fidelis.

Efeitos do enriquecimento ambiental sobre o balanço oxidativo hepático-muscular e resposta Inflamatória sérica em camundongos fêmeas / Débora Eduarda da Silva Fidelis. - Recife, 2025.

54f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, 2025.

Orientação: Fabricio Oliveira Souto.

Coorientação: Matheus Santos de Sousa Fernandes.

Inclui referências e anexos.

1. Doenças crônicas; 2. Sistema imune; 3. Estresse Oxidativo.
I. Souto, Fabricio Oliveira. II. Fernandes, Matheus Santos de Sousa. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

DÉBORA EDUARDA DA SILVA FIDELIS NÓBREGA

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE O BALANÇO
OXIDATIVO HEPÁTICO-MUSCULAR E RESPOSTA INFLAMATÓRIA SÉRICA
EM CAMUNDONGOS FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada à Saúde, Centro de biociências da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia aplicada à Saúde.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Paula Sandrin Garcia

Universidade Federal de Pernambuco (Examinadora Interna)

Prof^o. Dr. Anderson Apolonio da Silva Pedroza

Centro Universitário Facol (Examinador Externo)

Recife

2025

“Dedico este trabalho a Deus, ao meu esposo, aos meus pais e todo que me auxiliaram e me apoiaram nessa etapa da minha vida, sou grata a todos, amo vocês”

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve comigo em os momentos, me guiando, me protegendo e me capacitando. Não sou digna de sua graça, mas ele me concedeu através do seu sacrifício na cruz. Sou grata pelo privilégio em servi-lo, grata pois nos momentos mais difíceis ele se fez presente em minha vida.

Aos meus pais Eglauber da Silva Fidelis e Joana D'arc Maria da Silva Fidelis, meus sinceros e profundos agradecimentos, sem vocês eu não teria trilhado caminhos que trilhei. Vocês são pais incríveis, sou abençoada por tê-los em minha vida. Obrigada por tudo, eu amo vocês.

Ao meu esposo Robson Nóbrega, que nesse período sempre me apoiou, foi meu ombro amigo, meu suporte. Esteve comigo em todos os momentos, me encorajando, muito obrigada. Em nenhum momento você duvidou de mim, da minha capacidade, pelo contrário, sempre me incentivando a não desistir e atingir os meus objetivos. Eu sou muito grata pela sua vida, por tudo o que você representa, por tudo o que você fez e faz por mim. Você é um presente de Deus em minha vida, eu te amo.

Aos meus familiares, meus avós, tios, tias, primos. Todos participaram de certa forma desse processo, me apoiaram, me incentivaram, sentiram orgulho. Muito obrigada por tudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fabrício Souto, muito obrigada pela sua paciência, confiança e total disponibilidade para nos ajudar sempre que precisamos. O senhor é um presente de Deus para nossas vidas.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Matheus Santos, me faltam palavras para descrever toda a minha gratidão pela sua vida. Muito obrigada. Sempre acreditou em mim, até nos momentos em que eu mesma não acreditei. Obrigada por todos os momentos compartilhados desde a graduação, obrigada por ter abarcado nessa jornada conosco, obrigada por ser esse cara incrível, humano. Que você sempre se deixe ser instrumento nas mãos de Deus, você tem um propósito lindo nessa terra. Sou grata demais pela sua vida. Além de um professor, coorientador, se tornou um grande amigo.

Sou grata por todos aqueles que contribuíram para a chegada desse momento, tenha sido diretamente ou indiretamente. Todos os colegas do iLIKA, muito obrigada.

Aos meus amigos e colegas de profissão, muito obrigada. Que possamos levar a educação física a caminhos mais lindos e maiores.

A todos os meus professores, mestres, que passaram pela minha vida e contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigada! Vocês são essenciais.

“Não fui eu que ordenei a você? Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar. Josué 1:9"

RESUMO

O aumento de doenças crônicas tem se mostrado significativo entre a população mundial, e dentre alternativas de tratamentos para essas doenças, encontra-se fármacos e não-fármacos. As ferramentas não farmacológicas têm ganhado cada vez mais notoriedade no tratamento de comorbidades. Dentre essas alternativas de tratamento, encontra-se o Enriquecimento Ambiental (EA). **Objetivo:** Avaliar o efeito de três semanas de EA, sobre indicadores do equilíbrio oxidativo hepático e muscular, bem como na resposta inflamatória sérica em camundongos fêmeas. **Métodos:** Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, oriundos do biotério de criação e experimentação do Instituto Keizo Asami (iLIKA). Após o período de desmame aos 21 dias de vida, os camundongos fêmeas foram randomicamente alocados em 2 grupos e suas respectivas gaiolas: **(AP)** Ambiente padrão (n=11); **(AE)** Ambiente Enriquecido (n=13). Aos 40 dias de vida os animais foram eutanasiados para retirada do músculo esquelético, fígado e sangue através de punção cardíaca ventricular para devidas análises. **Resultados:** Observou-se na terceira semana de intervenção uma redução no peso corporal dos animais do AE ($p = 0,04$, $\Delta = -6.33\%$). Os níveis hepáticos de MDA ($p < 0,001$, $\Delta = -78.91\%$) e Carbonilas ($p = 0,04$, $\Delta = -12.25\%$), assim como no músculo esquelético MDA ($p = 0,02$, $\Delta = -62.60\%$) e Carbonilas ($p = 0,0002$, $\Delta = -27.67\%$), reduziram significativamente. Observamos um aumento nos níveis da defesa antioxidante enzimática hepática SOD ($p = 0,01$, $\Delta = 236.82\%$), CAT ($p = 0,0006$, $\Delta = 53.00\%$) e GST ($p = 0,002$, $\Delta = 163.63\%$), assim como no soro ($p = 0,02$, $\Delta = 117.54\%$), ($p = 0,02$, $\Delta = 99.65\%$) e ($p = 0,002$, $\Delta = 74.28\%$). Também observamos uma diminuição na razão GSH/GSSG no fígado e músculo esquelético, mas ao avaliar o estado REDOX hepático, o EA foi capaz de aumentar quando comparado ao ambiente padrão ($p = 0,04$, $\Delta = 348.36\%$). Observamos um aumento significativo nos níveis de sulfidrilas hepáticas ($p = 0,01$, $\Delta = 42.85\%$). Por fim, observamos os níveis séricos de citocinas anti e pró-inflamatórias, onde pudemos observar que o EA foi capaz de reduzir significativamente os níveis de IL-6 ($p = 0,03$, $\Delta = -9.13$) quando comparado ao ambiente padrão. **Conclusão:** Três semanas de EA foram capazes de modular positivamente o peso corporal, promover efeitos positivos nos marcadores ligados ao balanço oxidativo hepático e muscular. Além disso, reduzir os níveis séricos de citocina pró-inflamatória IL-6, ligada ao perfil Th1/Th2.

Palavras-Chave: Doenças crônicas; Sistema imune; Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

The increase in chronic diseases has been shown significantly among the world population, and among the treatment alternatives for these diseases, there are drugs and non-drugs. Non-pharmacological tools have gained increasing notoriety in the treatment of comorbidities. Among these treatment alternatives, there is Environmental Enrichment (EE). **Objective:** To evaluate the effect of three weeks of EE on indicators of hepatic and muscular oxidative balance, as well as on the serum inflammatory response in female mice. **Methods:** Female mice of the C57BL/6 lineage, originating from the breeding and experimentation vivarium of the Keizo Asami Institute (iLIKA), were used. After the weaning period at 21 days of age, the female mice were randomly allocated into 2 groups and their respective cages: (AP) Standard Environment (n=11); (AE) Enriched Environment (n=13). At 40 days of age, the animals were euthanized to remove skeletal muscle, liver and blood through ventricular cardiac puncture for appropriate analyses. **Results:** In the third week of intervention, a reduction in the body weight of the AE animals was observed ($p = 0.04$, $\Delta = -6.33\%$). Hepatic levels of MDA ($p < 0.001$, $\Delta = -78.91\%$) and Carbonyls ($p = 0.04$, $\Delta = -12.25\%$), as well as skeletal muscle MDA ($p = 0.02$, $\Delta = -62.60\%$) and Carbonyls ($p = 0.0002$, $\Delta = -27.67\%$), were significantly reduced. We observed an increase in the levels of the hepatic enzymatic antioxidant defense SOD ($p=0.01$, $\Delta = 236.82\%$), CAT ($p=0.0006$, $\Delta = 53.00\%$) and GST ($p=0.002$, $\Delta = 163.63\%$), as well as in the soleus ($p=0.02$, $\Delta = 117.54\%$), ($p=0.02$, $\Delta = 99.65\%$) and ($p=0.002$, $\Delta = 74.28\%$). We also observed a decrease in the GSH/GSSG ratio in the liver and skeletal muscle, but when evaluating the hepatic REDOX state, EA was able to increase it when compared to the standard environment ($p=0.04$, $\Delta = 348.36\%$). We observed a significant increase in hepatic sulfhydryl levels ($p=0.01$, $\Delta = 42.85\%$). Finally, we observed the serum levels of anti- and pro-inflammatory cytokines, where we were able to observe that EA was able to significantly reduce IL-6 levels ($p=0.03$, $\Delta = -9.13$) when compared to the standard environment. **Conclusion:** Three weeks of EA were able to positively modulate body weight, promote positive effects on markers linked to hepatic and muscular oxidative balance. In addition, reduce serum levels of the pro-inflammatory cytokine IL-6, linked to the Th1/Th2 profile.

Keywords: Chronic diseases; Immune system; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos dos protocolos de ambiente padrão e enriquecimento ambiental utilizados.....	28
Figura 2 - Dados sobre peso corporal médio de camundongos fêmeas após três semanas de enriquecimento ambiental.....	32
Figura 3 – Efeitos do Enriquecimento Ambiental sobre marcadores do Estresse Oxidativo hepático (MDA/CARBONILAS)	33
Figura 4 – Efeitos do EA sobre atividade enzimática hepática SOD/CATALASE/GST.....	34
Figura 5 – Efeitos do EA sobre marcadores ligados a defesas antioxidantes não enzimáticas e Sulfidrilas no fígado.....	35
Figura 6 –Efeitos do EA sobre marcadores de Estresse Oxidativo no músculo esquelético...	36
Figura 7 – Efeitos do EA sobre atividade antioxidante enzimática no músculo esquelético/sóleo(SOD/CATALASE/GST)	37
Figura 8 – Efeitos do EA sobre marcadores ligados a defesas antioxidantes não enzimáticas e Sulfidrilas no músculo esquelético.....	38
Figura 9 – Efeitos do EA sobre níveis séricos de citocinas anti-inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2 após três semanas de Enriquecimento Ambiental.....	39
Figura 10 - Efeitos do EA sobre níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2 após três semanas de enriquecimento ambiental.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tamanho do efeito produzido por três semanas de EA no peso corporal e balanço oxidativo hepático.....	41
Tabela 2 – Tamanho do efeito produzido por três semanas de EA balanço oxidativo no musculo esquelético.....	42
Tabela 3 – Tamanho do efeito produzido por três semanas de EA em níveis séricos de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2.....	43

LISTA DE SIGLAS

AE	Ambiente Enriquecido
AP	Ambiente Padrão
CAT	Catalase
EA	Enriquecimento Ambiental
EO	Estresse Oxidativo
GST	Glutathione S Transferase
GSH	Glutathione Reduzida
GSSG	Glutathione Oxidada
GSH/GSSG	Razão entre Glutathione Reduzida e Oxidada
IL	Interleucina
IL-6	Interleucina seis
IL-10	Interleucina dez
IFN-γ	Interferon gama
MDA	Malonaldeído
SI	Sistema Imunológico
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Medida da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

Sumário

1.INTRODUÇÃO	16
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO	17
2.2 FÍGADO	19
2.3 BALANÇO OXIDATIVO	21
2.4 MUSCULATURA ESTRIADA ESQUELÉTICA.....	22
2.5 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	25
3. HIPÓTESE.....	26
4. OBJETIVO	27
4.1 OBJETIVO GERAL	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
5.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS	27
5.2 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL	27
5.3 EUTANÁSIA E RETIRADA DOS TECIDOS	28
5.4 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO	28
5.4.1 MEDIDA DA SUBSTÂNCIA REATIVA AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	28
5.4.2 OXIDAÇÃO PROTEICA.....	29
5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE	29
5.5.1 SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	29
5.5.2 CATALASE (CAT)	29
5.5.3 GLUTATIONA S TRANSFERASE (GST)	30
5.6 ATIVIDADE NÃO ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE	30
5.6.1 GLUTATIONA REDUZIDA (GSH), OXIDADA (GSSG) E ESTADO REDOX (GSH/GSSG) 30	
5.6.2 SULFIDRILAS (TIÓIS TOTAIS)	30
5.7 DOSAGEM SÉRICA DE CITOCINAS LIGADAS AO PERFIL TH1/TH2	31
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
7. RESULTADOS	31
7.1 EFEITOS DO AMBIENTE ENRIQUECIDO NO PESO CORPORAL MÉDIO SEMANAL DE CAMUNDONGOS FÊMEAS.	31
7.2 EFEITOS DE TRÊS SEMANAS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO (MALONALDEÍDO/MDA E CARBONILAS) HEPÁTICO.	32
7.3 EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS NO FÍGADO (CATALASE/SUPERÓXIDO DISMUTASE/GLUTATIONA S TRANSFERASE)	33
7.4 RESPOSTAS DE TRÊS SEMANAS DE EA EM MARCADORES LIGADOS A DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS HEPÁTICAS: GSSG, GSH, ESTADO REDOX.....	34

7.5 EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE OS NÍVEIS DE SULFIDRILAS NO FÍGADO.....	35
7.6 EFEITOS DE TRÊS SEMANAS DO EA SOBRE INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO (MALONALDEÍDO/MDA E CARBONILAS) NO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	35
7.7 EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS NO SÓLEO (SOD, CATALASE, GST).....	36
7.8 RESPOSTAS DE TRÊS SEMANAS DE EA EM MARCADORES LIGADOS A DEFESAS ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO: GSSG, GSH, ESTADO REDOX.	37
7.9 EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE OS NÍVEIS DE SULFIDRILAS NO MÚSCULO ESQUELÉTICO (SÓLEO).....	37
8. NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS LIGADAS AO PERFIL TH1/TH2 APÓS TRÊS SEMANAS DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL.....	38
8.1 NÍVEIS SÉRICOS DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS LIGADAS AO PERFIL TH1/TH2 APÓS TRÊS SEMANAS DE ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL.....	39
8.2 CÁLCULO DO TAMANHO DO EFEITO PRODUZIDO PELO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM VARIÁVEIS LIGADAS AO BALANÇO OXIDATIVO HEPÁTICO E MUSCULAR, BEM COMO NÍVEIS DE CITOCINAS SÉRICAS EM CAMUNDONGOS FÊMEAS.....	41
9. DISCUSSÃO	44
10. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	46
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
REFERÊNCIAS	47
ANEXOS	52

1. INTRODUÇÃO

Um aumento significativo na prevalência mundial de doenças crônicas degenerativas tem sido associado a diferentes formas de estresse, os quais são gatilhos para processos disfuncionais que acometem tecidos biológicos, dentre esses o sistema imunológico (Battineni, et al. 2021). Associadas a essas alterações, outros mecanismos sofrem alterações, por exemplo o balanço oxidativo que se refere ao equilíbrio dinâmico entre a produção e eliminação, bem como espécies reativas de oxigênio (EROS) e de nitrogênio (ERN). Esse balanço é de suma importância para o organismo, principalmente porque a produção de EROS é útil fisiologicamente (Orfali, et al. 2024). Entretanto, quando se estabelece aumento excessivo dessas espécies pode-se ocasionar uma diminuição das defesas antioxidantes, promovendo o que chamamos de estresse oxidativo. (Afzal, et al. 2023)

Neste sentido, algumas ferramentas não farmacológicas têm sido utilizadas cada vez mais no combate de fisiopatologias dessas doenças crônicas, tais como o enriquecimento ambiental (EA). Este surge como alternativa, e em sua estrutura de estimulação possui elementos inanimados capazes de promover respostas psicológicas, fisiológicas, sensoriais e cognitivas positivas (Mohd Sahini, et al. 2024). Evidências recentes e estabelecidas de modo sistemático apontam que o EA foi capaz de reduzir a resposta pró-inflamatória em tecidos centrais e periféricos (Fernandes, et al. 2023), bem como de potencializar as defesas antioxidantes cerebrais em condições ambientais desfavoráveis, por exemplo em doenças e exposição a fármaco (Ramos, et al. 2024).

O Enriquecimento Ambiental é um paradigma, que promove modificações do ambiente em que animais estão inseridos com objetivo de melhorar seu bem-estar geral, fornecendo estímulos que atendam às necessidades específicas de cada espécie de animal para experimentação. O EA, estabelecido por Hebb em 1947, corresponde a experimentação a modificações ambientais positivas. Este ambiente foi capaz de promover alterações positivas no desenvolvimento neural e comportamental em ratos (Hebb 1947). Acredita-se que o EA promove diversas alterações em tecidos biológicos, incluindo o imunológico, hepático e muscular esquelético (de Sousa Fernandes, et al. 2022).

O sistema imune é composto por diferentes linhas de defesa inatas e adquiridas, que atuam no combate de patógenos e controle da resposta inflamatória, que pode ser regulada em nível celular, que são responsáveis pela produção de citocinas. Essas proteínas, são divididas por perfil de resposta pró e anti-inflamatória, que colaboram com a homeostase corporal e saúde. Sabe-se que, disfunções em sua funcionalidade estão relacionadas ao surgimento de doenças crônicas (Battineni, Sagaro et al. 2021). O tecido hepático e muscular esquelético são de extrema importância para manutenção da homeostase corporal, regulação metabolismo glicêmico e hipertrofia muscular (Ampong, et al. 2022). Desregulações nestes órgãos estão relacionados ao desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, sarcopenia e caquexia (Sano, et al. 2024).

Um desafio, entretanto, encontra-se na diversidade dos protocolos de EA (número de animais e objetivos, tamanho da caixa diversificado, presença ou ausência de roda de corrida), fazendo com que não haja um entendimento completo sobre suas respostas fisiológicas em diferentes tecidos corporais (de Sousa Fernandes, et al. 2022). Portanto, existe a necessidade de analisar os efeitos do enriquecimento ambiental na resposta inflamatória e balanço oxidativo hepático e muscular em modelo experimental. Com isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de três semanas de intervenção de Enriquecimento Ambiental (EA) no balanço oxidativo hepático e muscular, bem como na resposta inflamatória sérica de camundongos fêmeas juvenis.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico (SI) atua no controle e combate de patógenos que trabalham na regulação de processos inflamatórios. Além disso, disfunções em sua funcionalidade estão relacionadas ao surgimento de algumas doenças crônicas, incluindo diversos tipos de câncer (Battineni, Sagaro et al. 2021). O SI é dividido em duas partes determinadas de acordo com a velocidade e especificidade de sua resposta. Neste sentido, didaticamente denominamos em respostas inatas e adaptativas, que atuam de maneira integrada (Fulton et al. 2019).

A imunidade inata, ou natural é considerada a primeira linha de defesa e possui barreiras físico-químicas, microbiológicas, bem como é constituída por um perfil celular

imunológico como neutrófilos, monócitos, macrófagos, sistema complemento, citocinas e proteínas de fase aguda (Mantovani and Garlanda 2023). Por outro lado, a resposta imune adaptativa consiste em uma atividade predominante em animais evolutivamente superiores (Parkin and Cohen 2001). Essa resposta consiste em reações antígeno-específicas, principalmente através de linfócitos B e T (Costa, et al. 2019). No que diz respeito a velocidade de resposta, a imunidade inata possui alta velocidade e por conta disso às vezes danifica os tecidos por falta de especificidade. No entanto, a resposta imune adaptativa possui maior lentidão, especificidade e precisão, podendo levar vários dias ou semanas para ser executada (Chi, et al. 2024).

Algumas das células da imunidade inata possuem função de localizar patógenos em todo o corpo e destruí-los por vários mecanismos incluindo quimiotaxia, fagocitose e digestão de patógenos. Por exemplo, ao englobar o patógeno uma célula dendrítica, ela realiza migração a vasos do sistema linfático no sangue ou na linfa (Tadayon, et al. 2021). Em seguida, a célula dendrítica desloca-se através do tecido linfóide com o objetivo de encontrar um linfócito B ou T, isso inicia uma resposta imune adaptativa que normalmente ocorre dentro de alguns dias (Hampton and Chtanova 2019). Por fim, em nossos organismos diversos órgãos atuam imunologicamente, dentre eles amígdalas, timo, linfonodos, baço, fígado, medula óssea e vasos linfáticos, regulando de maneira sistêmica a resposta imune e produzindo rapidamente muitas células impedindo a propagação de um processo infeccioso (Fulton et al. 2019).

As citocinas são pequenas proteínas, principalmente produzidas pelo sistema imune inato e possuem o papel de atuar como mensageiros químicos que vão auxiliar na comunicação entre as células coordenando a resposta imunológica e inflamatória. As citocinas desempenham um papel crucial na proteção do corpo contra infecções e na preservação do equilíbrio (Arango Duque and Descoteaux 2014). As citocinas desempenham um papel na ativação e regulação de células imunológicas, tais como linfócitos, macrófagos e neutrófilos. Elas auxiliam na coordenação da reação do corpo a agentes patogênicos, tais como vírus e bactérias (Rahman, et al. 2023).

As citocinas são divididas entre dois grupos: pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (Tecchio, et al. 2014). Citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-alfa, IL-1, IL-2 e IL-6, desempenham um papel crucial na resposta imunológica inicial, estimulando a inflamação e atraindo células de defesa para o local da infecção ou dano. Por outro lado, outras

citocinas, como a IL-10, possuem um efeito anti-inflamatório, auxiliando na resolução da inflamação e na prevenção de danos exagerados aos tecidos (Hutchins, et al. 2013).

A resposta inflamatória é uma resposta do corpo a danos ou infecções, visando remover o agente causador do dano e começar o processo de recuperação. As citocinas desempenham um papel crucial nessa resposta. Elas exercem tanto efeitos de estímulo quanto de cura da inflamação (Popko, et al. 2010). Ao detectar patógenos ou lesões teciduais, uma célula do sistema imunológico libera citocinas pró-inflamatórias. Estas citocinas estimulam o dilatamento dos vasos sanguíneos e a expansão da permeabilidade vascular, o que facilita a chegada de células de defesa ao local da infecção ou dano. As citocinas pró-inflamatórias também ativam outras células imunológicas, como macrófagos e neutrófilos, e estimulam a produção de mais citocinas, amplificando a inflamação (Fahey and Doyle 2019). Com isso, após eliminar o agente infeccioso ou reparar o tecido, as citocinas anti-inflamatórias são ativadas para controlar e diminuir a inflamação, prevenindo danos aos tecidos e restaurando o equilíbrio (Loh and Vermeren 2022).

2.2 FÍGADO

O fígado é um órgão localizado no quadrante superior direito do abdômen e possui extrema relevância para vários processos biológicos, incluindo metabólicos, regulação de volume sanguíneo, sistema imunológico, controle endócrino e homeostase de lipídios (Fritsche, et al. 2023). É composto por hepatócitos, células epiteliais, de Kupffer e endoteliais sinusoidais. Nesse vasto número celular, existe uma função designada a cada uma, que auxiliam na regulação da função hepática em vários níveis (Gong, et al. 2022).

Além de atuar no metabolismo, o fígado também atua na linha de frente do sistema imunológico, detectando patógenos que venham a adentrar no organismo através do intestino (Chong Neto, et al. 2019). É o órgão com maior número de células fagocíticas do corpo. Além disso, tem a capacidade de resposta rápida, sendo capaz de gerar uma resposta imunológica eficaz (Jiang, et al. 2021). Mesmo sendo primordial para a produção de proteínas e metabolismo de nutrientes, ele também foi projetado para ser um mediador entre células imunes e patógenos presentes na corrente sanguínea (Kubes and Jenne 2018).

Por outro lado, o fígado atua como desintoxicante em alguns momentos. Essa função de desintoxicação é crucial para a saúde, já que o fígado filtra substâncias potencialmente danosas ao organismo, mantendo o corpo livre de toxinas e compostos

perigosos. Por exemplo a metabolização do álcool etílico em substâncias não nocivas por meio de enzimas como a álcool desidrogenase e a aldeído desidrogenase (Hurley and Edenberg 2012). O fígado também é responsável pela metabolização de diversos medicamentos e substâncias, tornando-os solúveis em água para sua eliminação. Algumas substâncias, como o paracetamol, podem ser letais em doses elevadas, demandando a habilidade do fígado de desintoxicar-se (Chidiac, et al. 2023), através dos hepatócitos que monitoram quais conteúdos presentes no sangue e fazem a remoção de substâncias que possam ser tóxicas antes delas chegarem ao corpo todo (Schulze, et al. 2019). A metabolização dessas substâncias tóxicas é realizada através de enzimas de hepatócitos, após a finalização desses processos, o órgão também metaboliza e remove os hormônios da circulação que são produzidos pelas próprias glândulas do corpo (Robinson, et al. 2016).

No metabolismo os hepatócitos são os encarregados por metabolizar proteínas, lipídios e alguns carboidratos. Os hepatócitos absorvem uma boa parte da glicose e armazenam como glicogênio. Essa absorção e liberação de glicose através das células hepáticas faz com que a homeostase seja mantida e realiza uma proteção do corpo de perigosos pontos e níveis de glicose (Luz, et al. 2021). O sangue que passa pelo fígado é carregado de ácidos graxos que são absorvidos pelas células hepatócitos e metabolizados para produzir energia na forma de ATP (Mashek 2013).

O fígado também está atrelado a digestão, onde ele desempenha um papel no processo de digestão através da bile (Peng, et al. 2023). A bile é uma mistura de alguns sais biliares, colesterol e bilirrubina pigmentar. Os hepatócitos produzem a bile, que passa pelos ductos biliares para poderem ser armazenados na vesícula biliar (Spatz, et al. 2021). A bile percorre os chamados canais biliares e é liberada no duodeno (porção intestinal) onde realiza a emulsificação de gorduras encontradas no corpo. Já a bilirrubina presente na bile é um produto gerado pelos glóbulos vermelhos desgastados pelas células de Kupffer (Gao, et al. 2022).

Por outro lado, o fígado armazena vários nutrientes que são essenciais, algumas vitaminas e minerais. O armazenamento e direcionamento desses nutrientes faz com que o fígado consiga manter homeostase, além disso, o órgão também acumula vitaminas e minerais como vitaminas A, D, E, K e vitamina B12, e de minerais o ferro e cobre. Isso faz com que haja um suprimento das substâncias que são primordiais para vários tecidos do corpo (Nagashimada and Ota 2019). Além disso, é responsável também pela produção de

inúmeros componentes importantes para o plasma sanguíneo como; albuminas, protrombinas; fibrinogênio. A coagulação sanguínea tem como fatores de coagulação as proteínas de protrombina e fibrinogênio. Já as albuminas são proteínas que mantêm o sangue com o seu meio isotônico regular, de maneira que as células do organismo não perdem ou ganham água na presença dos fluidos corporais, isso auxiliando também na homeostase do plasma sanguíneo (Grüngreiff, et al. 2021).

Por fim, no sistema imunológico, o fígado segue sendo um órgão funcional através das células de Kupffer, mais precisamente pelas funções celulares já que revestem os sinusóides, ou vasos sanguíneos. As células de Kupffer são macrófagos de tipo fixo que fazem parte do sistema fagocitário mononuclear, atrelado com macrófagos do baço (Bonnardel, et al. 2019). Esses tecidos celulares, tem uma função bastante importante de capturar e digerir bactérias, fungos, parasitas, detritos celulares, células sanguíneas que estão em desuso/gastas, fazendo uma ação rápida de varredura no sistema, já que o sangue em seu grande volume passa pelo sistema de porta hepático e pelo fígado permitindo que os macrófagos de Kupffer realizem a sua ação imediata de limpeza do grande volume de sangue disponível em determinado momento (Sakai, et al. 2019).

2.3 BALANÇO OXIDATIVO

O metabolismo é o conjunto de reações químicas mediada por complexos multienzimáticos, que ocorrem com a finalidade de manter a homeostase corporal e a vida. Além disso, auxilia na produção de energia através da formação de ATP (adenosina trifosfato), também nas mitocôndrias (Li, et al. 2024). Nestas organelas, as moléculas de ATP são formadas aerobicamente, através do ciclo de Krebs, cadeia transportadora de elétrons e beta-oxidação (Noronha, et al. 2022). Além disso, as mitocôndrias são os principais sítios de produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, principalmente. Os radicais livres atuam como mediadores na transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, como; na cadeia transportadora de elétrons, no metabolismo dos ácidos graxos (Beta-Oxidação), no ciclo de Krebs e em reações enzimáticas do estado REDOX (Kehrer and Klotz 2015). Quando formados em condições fisiológicas, esses radicais são essenciais para a produção de ATP através da cadeia respiratória, facilitam a ativação de genes que participam de mecanismos de defesa do organismo contra infecções (Sies 2015).

Por outro lado, as EROS são moléculas instáveis que são geradas naturalmente através do metabolismo celular (Murphy, et al. 2022). Contudo, quando se há um desbalanço decorrente da produção excessiva dessas substâncias, associada às deficiências nas defesas antioxidantes ocasionando um fenômeno denominado estresse oxidativo podendo causar danos oxidativos às células e tecidos (Jones 2008). Alguns radicais livres como o radical hidroxila (OH) e o radical superóxido (O_2^-); peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode se decompor para formar radicais livres e óxido nítrico (NO), podem interagir com outras espécies e gerar compostos reativos (Jomova, et al. 2023).

A constante geração de radicais livres durante os processos metabólicos resulta no desenvolvimento de estratégias de defesa antioxidante, encarregadas de regular os níveis dessas espécies reativas no interior das células e reduzir os prejuízos que podem provocar (Chandimali, et al. 2025). Normalmente, esses sistemas de defesa antioxidante se dividem em dois grupos: (1) enzimático, composto principalmente por superóxido dismutase, catalase, glutathione S transferase (GST), e o (2) não enzimático, composto por exemplo pelas glutathionas oxidada e reduzida, bem como as sulfidrilas ou tióis totais (Finkel and Holbrook 2000).

No entanto, em condições de desequilíbrio como o estresse oxidativo, provoca-se a degradação de biomoléculas (lípidos e proteínas), podendo prejudicar suas funções biológicas e/ou provocar desordem homeostática, resultando em danos severos e morte celular programada (Liu, et al. 2023). Cronicamente, esses processos acarretam contribuições importantes na gênese de diversas doenças crônicas, tais como diabetes, obesidade, aterosclerose, distúrbios neurodegenerativos e câncer (Senoner and Dichtl 2019). Portanto, é crucial analisar e entender o balanço oxidativo sobre diferentes condições ambientais, bem como o sistema antioxidante, enfatizando como eles impactam no combate ao estresse oxidativo.

2.4 MUSCULATURA ESTRIADA ESQUELÉTICA

O sistema muscular esquelético é responsável pela estruturação do corpo, dando estabilidade e movimento. É formado por alguns tecidos como o osso que formam o esqueleto, articulações, tendões, músculos e ligamentos. Didaticamente, os músculos são classificados em esquelético, liso e cardíaco. Os músculos também são produtores de força, variável que depende do tamanho de sua área de secção transversa (Hall and Guyton 2011).

No corpo humano são encontrados 600-700 músculos esqueléticos que apresentam a contração chamada voluntária. Formados por células multinucleadas alongadas denominadas como fibras musculares, uma característica marcante desse tipo de tecido é a presença forte de variações transversais. Essas células, representadas como fibras, são dotadas de dois filamentos proteicos com capacidades contráteis, chamados de filamento de actina e miosina. Os miofilamentos ou filamentos finos são a associação entre a actina e algumas outras proteínas como troponina e tropomiosina (Roberts, et al. 2019). Os filamentos grossos são formados pela miosina. Esses dois tipos de miofilamentos alternam-se de modo que formam as bandas claras e escuras. Os claros são formados pelos finos que são denominados de banda I, isotrópicas (Remeniéras, et al. 2021). Enquanto as bandas escuras são classificadas como banda A, pois são anisotrópicas. Ao centro da banda I se encontra uma linha de porte escuro, que é apropriada como Z. Responsável por delimitar o sarcômero, já que ele é formado pela junção de duas bandas I (Caremani and Reconditi 2022).

Dentre as funções do músculo esquelético, está a responsabilidade de sustentação e manutenção de uma boa postura, através do trabalho em conjunto com toda a estrutura óssea. Por ser uma musculatura de contração voluntária, ou seja, por ser contraído conscientemente são controlados pelo cérebro. Os músculos esqueléticos respondem a comandos do indivíduo (Brooks, et al. 2023). A prática regular de exercícios físicos ocasiona no aumento do ventre muscular, chamado de processo hipertrófico, ou hipertrofia (Lim, et al. 2022).

Embora façam parte de uma sistematização, a diferença entre músculo esquelético e liso, não se dá apenas pela informação de serem diferentes em termos de fibras/estriação, e sim de que os lisos controlam funções que não estão em domínio de uma pessoa. O músculo liso envolve várias artérias e realiza movimentos de contração para auxiliar no fluxo sanguíneo e ajustar o mesmo. Envoltor no intestino, ele também auxilia no processo de digestão, realizando contração para indicar o fluxo digestivo a ser realizado, e o direcionamento de fezes. Realiza contração involuntária e lenta, sendo encontrado principalmente no sistema digestório e respiratório e ausente de estriações (McCann, et al. 2021).

A constituição do coração também é realizada através da participação de músculos, nesse caso, do estriado cardíaco. Essa musculatura não faz parte do sistema músculo esquelético, propriamente por ser exclusivo do coração. A microscopia revela a aparência desse músculo como sendo estriada, mostrando um padrão regular de fibras presentes. A contração muscular

se dá de forma vigorosa e involuntária, realizando movimentos contráteis e de relaxamento (Sayers and Riley 2021).

Cada músculo e articulação tem determinadas propriedades que são específicas e adequadas de cada um, para que haja a realização de determinada tarefa. Algumas dessas podem ser funções complementares ou específicas, de modo que na estrutura muscular humana, o sóleo, vasto lateral e glúteo médio são considerados os músculos mais fortes baseados pela área transversal fisiológica (PCSA), ou seja, de maneira distal onde não se encontra tanta densidade ou volume muscular, é lá onde se encontram os três grupos de músculos mais resistentes (Leonard, et al. 2020)

Podendo ser visto como um dispositivo biomecânico que compartilha de várias interações de componentes distintos, incluindo nervos autônomos responsáveis pela transmissão de impulsos. O músculo é composto pelas chamadas células satélites, essas que são pequenas células que contribuem para o crescimento do músculo principalmente na fase embrionária e pós-natal da criança, ficando em repouso na fase adulta (Yin, et al. 2013). Alguns estudos afirmam que esses grupos celulares são negativamente regulados por uma proteína, a miostatina. Essa afirmativa é embasada na ideia de que essa mioquina gera inibição direta e indiretamente do crescimento muscular em humanos (Dumont, et al. 2015).

O exercício físico libera moléculas inflamatórias como algumas citocinas e fatores de crescimento que estimulam as células satélites a saírem do estado de quiescência fazendo com que o trabalho delas sejam iniciados. Alguns fatores são essenciais para ativação celular. Outros terão finalidades distintas, mas sempre com o mesmo objetivo de reparar e melhorar a musculatura do corpo. Estudos demonstraram que o treinamento de resistência em atletas faz com que haja um aumento de células satélites no músculo esquelético desses indivíduos, que auxiliam na regeneração muscular (Montarras, et al. 2005)

O fluxo sanguíneo (FS) é distribuído pelo músculo. Durante a realização de exercícios físicos, devido a vasoconstrição há um aumento significativo desse fluxo, e isso se dá pelo redirecionamento para áreas de maior demanda metabólica/energética, como o músculo estriado esquelético que está envolvido naquele momento na atividade (Centner, et al. 2019). Após o relaxamento dos pré-capilares, uma perfusão aumentada do tecido é resultante em um aumento do sangue devido a vasodilatação de vasos. O aumento do FS é causado principalmente por efeitos químicos que promovem essa dilatação, como o oxigênio sendo reduzido nos tecidos musculares. O músculo esquelético é de suma importância não apenas

no quesito estrutura, mas também em funções metabólicas que ocorrem no organismo, gerando calor corporal e contribuindo também para a pressão arterial, que pode ser regulada também pelo exercício físico (Pignanelli, et al. 2021).

2.5 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

O EA foi estabelecido por Donald Hebb na década de 1940, onde demonstrou que a promoção de condições ambientais favoráveis foi capaz de promover alterações no desenvolvimento neuronal e comportamental em ratos (Singhal, et al. 2014). O paradigma do EA, relaciona-se à inserção de objetos inanimados (brinquedos, túneis, material de nidificação e escadas, que por sua vez são capazes de efeitos cognitivos, sensoriais, motores e interação social através de grandes grupos de animais e ambiente amplo (Kempermann 2019).

Diferentes protocolos do EA, cada vez mais vem sendo utilizado no mundo animal, seja com intervenção para tratamento de condições adversas (doenças, transtornos psicológicos, ou exposição à tóxicos, dentre outros) ou ludicidade (Nik Ramli, et al. 2024). A literatura demonstra, que o EA pode ser dividido em cinco tipos diferentes: social, nutricional, sensorial, físico e cognitivo (Lauderdale, et al. 2022), que podem ser integradas em um mesmo protocolo. Por exemplo, EA social, ocorre através do estímulo a mediante o agrupamento dos animais em seu ambiente, sendo a alternativa viável para que haja uma interação entre eles, promovendo um ambiente menos estressor (Caselli, et al. 2022). Fatores sociais e ambientais influenciam positivamente o estresse devido a modulação de fatores neuronais. Um deles consiste na expressão de neurofinas, incluindo o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) que desempenha um papel enorme e crítico na regulação da agressividade. Sabe-se que o EA é capaz de potencializar a expressão desta neurotrofina em diferentes áreas cerebrais, tais como hipocampo demonstrando o efeito promissor dessa ferramenta não farmacológica (Aleyasin, et al. 2018)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) após a pandemia de COVID-19, muito se fala sobre a promoção de saúde e qualidade de vida para todos, buscando novas maneiras de propagar cada vez mais saúde. Nesse sentido, delas o EA vem crescendo cada vez mais, através dos seus resultados benéficos em vários tecidos e sistemas do organismo. Por exemplo, após uma exposição ao EA, ratos mostraram uma produção aumentada de BDNF no hipotálamo, repercutindo de forma confiável no desempenho de tarefas de aprendizagem e memória, em comparação com animais em condições padrão de moradia (Otaki, et al. 2018), mostrando que o EA afeta funções cerebrais. Acredita-se, que esses resultados ocorreram por

meio do aumento das oportunidades de exploração, interação social e atividade física, o que leva a acreditar que a exposição à EA pode melhorar de forma confiável a função cognitiva e atenua patologias de algumas patologias (Bayat, et al. 2015).

No sistema imunológico, os efeitos do EA são bastante promissores em modelos fisiológicos e patológicos, incluindo diferentes tipos de câncer. Vale destacar, que mecanismos pelos quais esses benefícios ocorrem ainda se encontram pouco esclarecidos. Por outro lado, um estudo de revisão sistemática conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrou que diferentes protocolos de EA, foram capazes de modular positivamente o sistema imunológico e seus componentes em órgãos centrais e periféricos. Além disso, observou-se que o EA reduziu a resposta inflamatória molecular e celular em tecidos cerebrais, linfonodo e medula óssea, bem como promoveu aumento dos indicadores anti-inflamatórios (de Sousa Fernandes et al. 2022). Otaki e colaboradores em 2018, observaram mudanças positivas na resposta fagocítica e na produção de quimiocinas de macrófagos peritoneais residentes após camundongos terem sido alojados sob condições de EA por 6 ou 8 semanas.

Por fim, outro estudo sistemático da literatura demonstrou que o EA causou modulação positiva no balanço oxidativo cerebral, potencializando a resposta antioxidante, bem como diminuição de indicadores ligados ao estresse oxidativo celular em condições ambientais desfavoráveis (de Sousa Fernandes, et al. 2024). O compêndio destes benefícios, demonstra que o EA aplicado de forma adequada pode ser uma possível ferramenta para maximizar funções fisiológicas garantindo a homeostase corporal e alternativa de baixo custo e viabilidade experimental para contenção de processos fisiopatológicos relacionados à disfunção do balanço oxidativo e do sistema imune, deste modo auxiliando no tratamento e reabilitação de inúmeras doenças crônicas (Xiao, et al. 2021).

3. HIPÓTESE

O enriquecimento ambiental é capaz de regular positivamente o balanço oxidativo hepático e muscular esquelético e resposta inflamatória sérica em camundongos fêmeas da linhagem C57BL6 com 60 dias de vida.

4. OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de três semanas de enriquecimento ambiental no balanço oxidativo hepático e muscular esquelético e resposta inflamatória sérica em camundongos fêmeas com 60 dias de vida.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar Indicadores do estresse oxidativo (Malonaldeído e Carbonilas);
- b. Avaliar Defesas antioxidantes enzimáticas (Superóxido Dismutase - SOD; Catalase – CAT e Glutathione S Transferase – GST);
- c. Avaliar o sistema componentes do sistema antioxidante não enzimáticos (Glutathione reduzida – GSH; Glutathione Oxidada – GSSG; Estado REDOX – GSH/GSSG, Tióis Totais);
- d. Dosar níveis plasmáticos de citocinas relacionadas ao perfil Th1/Th2 (IL-2; IL-6; IL-17A, TNF- α e IFN- γ ; IL-4;).
- e. Dimensionar o tamanho do efeito produzido pelo enriquecimento ambiental.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem *C57BL/6* oriundos do biotério de criação do Instituto Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (iLIKA/UFPE). Os animais foram mantidos em biotério de experimentação com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$. Além disso, eles tiveram consumo de água e ração comercial padrão (Nuvilab CR1, Nuvital®) *ad libitum*. Aos 21 dias de vida, os camundongos foram randomicamente alocados em 2 grupos: **(AP)** Ambiente padrão (n=11); **(AE)** Ambiente Enriquecido (n=13) com duração de protocolo de 3 semanas. O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco, sob número de protocolo 0057/2024. O cuidado com os animais seguiu as recomendações do *National Institutes of Health (NIH)*.

5.2 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Inicialmente foi realizada a padronização do protocolo de enriquecimento ambiental para os camundongos de linhagem *C57BL/6*. Este consistiu na adição de objetos inanimados capazes de produzir estimulação sensorial, cognitiva, psicológica e locomotora, principalmente através do comportamento exploratório destes roedores. Adicionalmente, segundo os diferentes protocolos publicados na literatura científica recomenda-se que o

número de animais seja maior, bem com o espaço da gaiola em comprimento, largura e altura, em relação aos animais inseridos no ambiente padrão visando estabelecer maior mobilidade espacial e sociabilização. Além disso, foram utilizados diferentes objetos em plástico (túneis, escadas, brinquedos), madeira (brinquedos e tocas) e roda de corrida. As dimensões de cada gaiola foram as seguintes: Enriquecimento ambiental (comprimento: 44 cm x altura: 17 cm x largura: 30 cm); Ambiente Padrão (comprimento: 27 cm x altura: 12 cm x largura: 17 cm). Por fim, com objetivo de potencializar o aumento na complexidade e variabilidade do ambiente, a cada semana a posição dos objetos e seu número foi modificado, durante as 3 semanas de protocolo.



Figura 1. Exemplos dos protocolos de ambiente padrão e enriquecimento ambiental utilizados.

5.3 EUTANÁSIA E RETIRADA DOS TECIDOS

Os camundongos de ambos os grupos foram eutanasiados ao final da terceira semana (ambiente padrão e enriquecimento ambiental). Para isso, foi utilizado a combinação dos fármacos cloridrato de Ketamina (0,1mL/ Kg) e Xylasina, (10 mg/Kg), que foram aplicação intraperitoneal. Em seguida, foram retirados o fígado e músculo sóleo, além disso o sangue foi coletado por punção cardíaca ventricular esquerda, para posterior análise do soro.

5.4 BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

5.4.1 Medida da substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para dosagem de malonaldeído (MDA), foi utilizada a técnica colorimétrica descrita inicialmente por Buege e Aust (1978), com finalidade de avaliar a peroxidação lipídica. Para isso, uma alíquota do homogenato do fígado e do músculo sóleo foram associadas ao ácido tricloroacético (TCA) a 30% e Tris-HCL (3mM, pH 7,4) após este momento foi realizada uma

centrifugação a 3.000 rotações por minuto (RPM) em 10 minutos e adição de ácido tiobarbitúrico a 0,73%, reagindo com os produtos da peroxidação lipídica e formando um composto de coloração rosada. Em seguida, o composto foi incubado por quinze minutos a 100^o C. Após este processo, foi utilizada uma cubeta de vidro para leitura da absorbância a 535 nm. Os resultados foram expressos em milimoles por nmol/miligrama de proteína (Buege and Aust 1978).

5.4.2 Oxidação proteica

Para avaliação do nível de oxidação de proteínas foi realizada a análise de carbonilas descritas por Reznick e Packer (1994). Ao homogenato dos tecidos hepático e muscular esquelético mantido em gelo, foi adicionado TCA 30% e levado à centrífuga por 14 minutos a 1.180g. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 10mM de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) e incubado em sala escura a temperatura ambiente por uma hora com agitação programadas a cada 15 minutos. Após período de 28 incubação, as amostras foram lavadas em tampão etil/acetato e centrifugadas três vezes e o pellet ressuscitado em 6 M de hidrocloreto de guanidina, incubado por 30 minutos a 37°C e a absorbância verificada a 370nm. Os resultados foram expressos em nmol/miligrama de proteína (Reznick and Packer 1994).

5.5 ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE

5.5.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase foi avaliada através do método da oxidação da adrenalina, o qual compete com a SOD podendo ser medido em espectrofotômetro a 480nm. Em uma cubeta de quartzo de 1mL, foi adicionado tampão carbonato 0,1M (pH10,2), EDTA 0,1mM, amostra e adrenalina 150mM. A diminuição na absorbância foi seguida por 90 segundos a 30°C no comprimento de onda de 480nm e os resultados expressos em U/mg proteína (Misra and Fridovich 1972).

5.5.2 Catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) foi avaliada através da decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂), verificada por uma absorbância de 240 nm numa temperatura de 20°C. Em um meio de reação, contendo tampão fosfato 50mM (pH 7,0) amostra e H₂O₂ 0,3mM. A absorbância foi analisada durante 3 minutos e os resultados foram expressos em U/mg (Hugo and Lester 1984).

5.5.3 Glutathione S transferase (GST)

Foi realizada a atividade da Glutathione-S-Transferase (GST) descrita inicialmente por Habig (1974). O procedimento constituiu da adição de tampão fosfato de potássio 0,1M (pH 6,5); EDTA 1mM; GSH 1mM; amostra e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 1mM. A atividade enzimática foi avaliada a partir da formação de 2,4-dinitrofenil-s-glutathione (DNP-SG) por minuto a 30°C, sendo monitorada via espectrofotômetro com comprimento de onda igual a 340nm. A atividade da GST foi expressa em U/mg proteína (Habig and Pabst 1974).

5.6 QUANTIFICAÇÃO DO SISTEMA NÃO ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE

5.6.1 Glutathione Reduzida (GSH), Oxidada (GSSG) e Estado REDOX (GSH/GSSG)

O meio para realização do ensaio foi composto por tampão fosfato 0,1M (pH 8,0) contendo EDTA 5mM e amostra, o qual foi incubado com O-Phthaldialdehyde (OPT) 1mg/mL em temperatura ambiente por 15 minutos. Depois da incubação, sua fluorescência foi analisada em um comprimento de excitação e emissão de 350nm e 420nm, respectivamente. Para análise dos níveis de GSSG, as amostras foram incubadas com N-ethylmaleimida (NEM) 0,04M por 30 minutos a temperatura ambiente seguido pela adição do tampão NaOH 0.1M ao meio. Em seguida, as amostras foram incubadas com o-Phthaldialdeído (OPT) 1mg/mL em temperatura ambiente por 15 minutos e tiveram sua fluorescência comparada a uma curva de concentrações conhecidas de GSSG, os resultados foram expressos em μ M/miligrama de proteína. O estado REDOX foi determinado pela razão GSH/GSSG com previamente descrito (Hissin and Hilf 1976).

5.6.2 Sulfidrilas (Tióis totais)

O conteúdo total e do grupo sulfidrilas ligado à proteína foi descrito por Aksenov e Markesbery (2001) (Aksenov and Markesbery 2001). A redução de 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) pelos grupos tiol foi medida em homogenato de 200 mg de proteína, resultando na geração de um composto como pigmentação amarela, cuja absorção é medida espectrofotometricamente a 412 nm (Ellman 1959, Walmsley, Abernethy et al. 1987). Os resultados foram expressos em mM/miligrama de proteína.

5.7 DOSAGEM SÉRICA DE CITOCINAS LIGADAS AO PERFIL TH1/TH2

As amostras de sangue, foram coletadas em tubos *eppendorff*, através de uma punção cardíaca na ventricular esquerda. Para a obtenção do soro, os tubos foram centrifugados a 3000 RPM durante 10 min, a 4°C. Em seguida, foram congelados a -80°C. Os kits de CBA (*Cytometric Bead Assay*, BD Biosciences) foram usados para análise das citocinas: (IL-2; IL-4; IL-6; IL-10; IL-17A, TNF- α e IFN- γ). Para todos os procedimentos seguimos as instruções do kit para a reação, o ensaio foi adquirido por citometria de fluxo (Accuri C6™, BD Biosciences©) e os dados obtidos foram analisados com software FCAP Array 3.0 (BD Biosciences©).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise exploratória dos dados foi associada ao teste de normalidade de *Shapiro-Wilk*. E seguida, a comparação entre os grupos será realizada através do teste T *Student* não pareado ou Teste U-*Mann Whitney*, a depender da distribuição normal. Para comprovação dos possíveis efeitos produzido pelo enriquecimento ambiental foi utilizado o teste de Hedges'g com magnitude do efeito pré-estabelecida em pequeno (0.2-0.5); médio (0.5-0.8) e grande (>0.80). A significância foi estabelecida em $p < 0,05$ (5%). Para análise dos dados foi utilizada o software Graphpad Prisma versão 10 (*Graphpad Software Inc, La Jolla, CA, USA*).

7. RESULTADOS

7.1 Efeitos do ambiente enriquecido no peso corporal médio semanal de camundongos fêmeas.

Inicialmente, analisamos os efeitos do EA no peso corporal de camundongos fêmeas durante as três semanas de protocolo. Para verificar a homogeneidade do peso corporal entre os grupos, analisamos seus valores médios antes do início da exposição ao EA e não encontramos diferenças significativas (AP: $16,23 \pm 5,30g$ vs EA: $16,62 \pm 5,81$, $p=0,86$), (Figura 2A). Semelhantemente, após a primeira semana de intervenção com EA, não observamos significância entre os grupos (AP: $18,00 \pm 3,97$ vs EA: $19,23 \pm 2,52$, $p=0,38$), (Figura 2B). Por outro lado, após a segunda semana de intervenção, observamos um aumento significativo no peso corporal no grupo EA, quando comparado ao AP (AP: $18,36 \pm 1,12$ vs EA: $23,38 \pm 3,38$, $p = 0,0005$, $\Delta = 27.34\%$), (Figura 2C). Entretanto, ao final das três semanas do protocolo, observamos uma diminuição significativa no peso corporal no grupo EA quando comparado ao AP (AP: $20,67 \pm 1,03$ vs EA: $19,36 \pm 1,28$, $p = 0,04$, $\Delta = -6.33\%$), (Figura 2D).

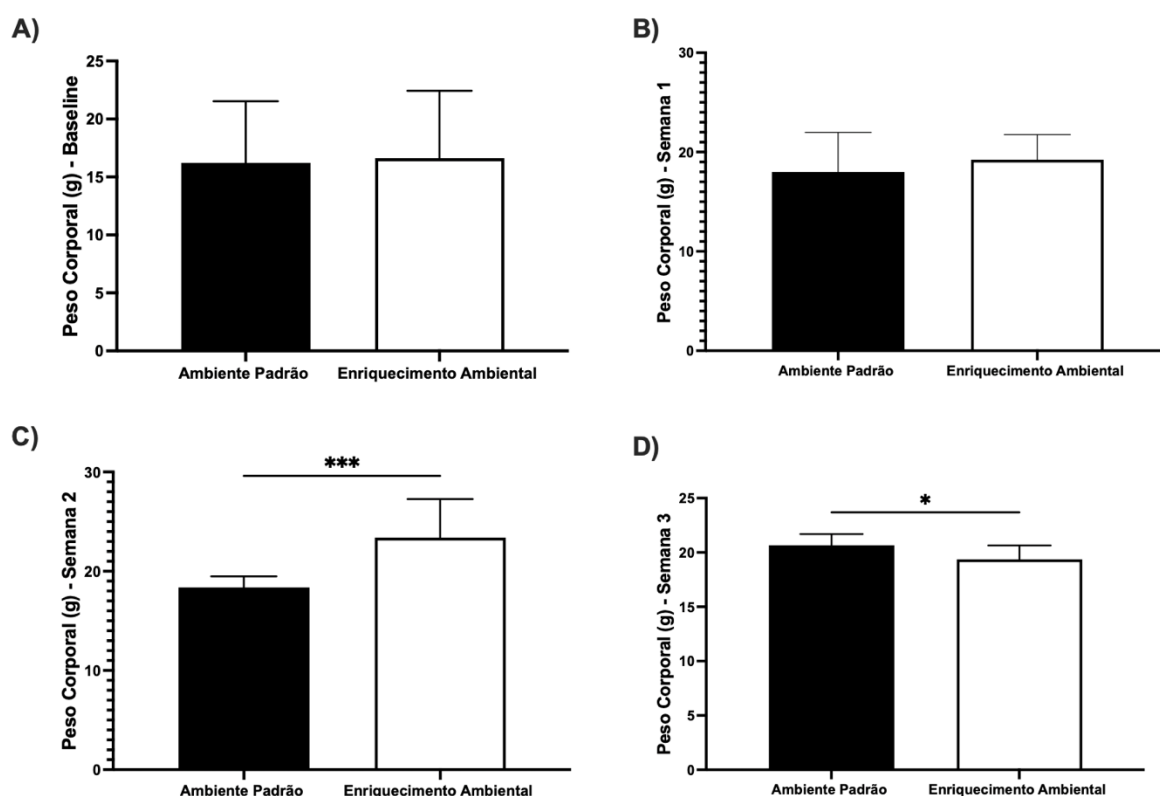


Figura 2. Dados sobre peso corporal médio de camundongos fêmeas durante as três semanas de enriquecimento ambiental. (A) *Baseline* (EA: n=13 e AP: n=11); (B) Semana 1 (EA: n=13 e AP: n=11); (C) Semana 2 (EA: n=13 e AP: n=11); (D) Semana 3 (EA: n=13 e AP: n=11). *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

7.2 Efeitos de três semanas do enriquecimento ambiental em biomarcadores de Estresse Oxidativo (Malonaldeído/MDA e Carbonilas) hepático.

A seguir, avaliamos os efeitos de três semanas de EA sobre biomarcadores de estresse oxidativo hepático. Ao analisarmos os níveis de MDA, observamos uma diminuição estatisticamente significativa após 3 semanas de EA quando comparado ao grupo AP (AP: $95,77 \pm 27,08$ vs EA: $20,19 \pm 11,14$, $p < 0.0001$, $\Delta = -78.91\%$), (Figura 3A). Além disso, avaliamos carbonilas responsáveis pela oxidação de proteínas. Semelhantemente, identificamos que o EA foi capaz de reduzir significativamente os níveis de oxidação proteica quando comparado ao grupo AP (AP: $1,55 \pm 0,09$ vs EA: $1,36 \pm 0,11$, $p = 0.04$, $\Delta = -12.25\%$), (Figura 3B).

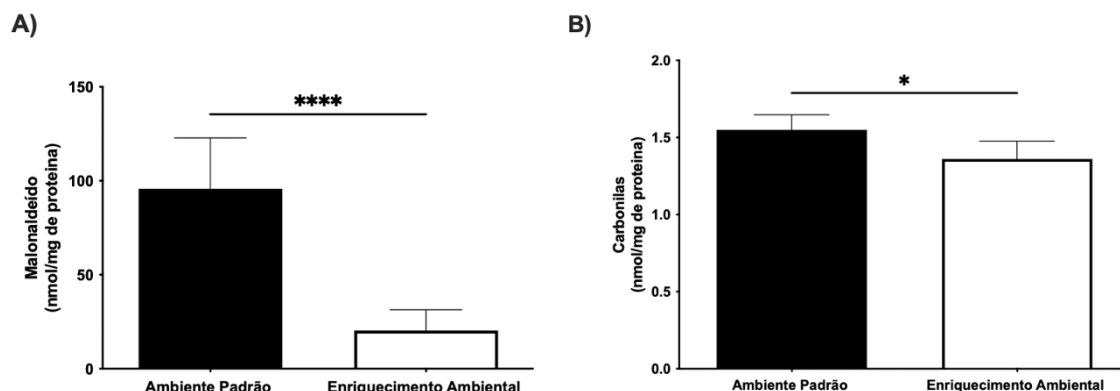


Figura 3. Efeitos do Enriquecimento Ambiental sobre marcadores do Estresse Oxidativo (Malonaldeído e Carbonilas) hepático. (A) MDA (EA:n=7 e AP: n=4); (B) Carbonilas (EA:n=7 e AP: n=3) *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

7.3 Efeitos do Enriquecimento Ambiental sobre defesas Antioxidantes Enzimáticas no fígado (Catalase/Superóxido Dismutase/Glutationa S Transferase)

As atividades de SOD, CAT e GST foram avaliadas para testar os efeitos do EA no sistema enzimático antioxidante hepático. Em nossos resultados, ao analisarmos a atividade da SOD no fígado após três semanas de EA, identificamos um aumento significativo quando comparado ao AP (AP: $26,67 \pm 16,80$ vs EA: $89,83 \pm 7,67$, $p = 0.01$, $\Delta = 236.82\%$), (Figura 4A). Resultados semelhantes foram encontrados na atividade da catalase (AP: $6,98 \pm 0,49$ vs EA: $10,58 \pm 1,30$, $p = 0,0006$, $\Delta = 53.00\%$), (Figura 4B) e GST (AP: $0,99 \pm 0,23$ vs EA: $2,61 \pm 0,59$, $p = 0,002$, $\Delta = 163.63\%$), (Figura 4C), onde observamos aumento hepático significativo desses dois marcadores ligados ao sistema enzimático antioxidante após três semanas de EA.

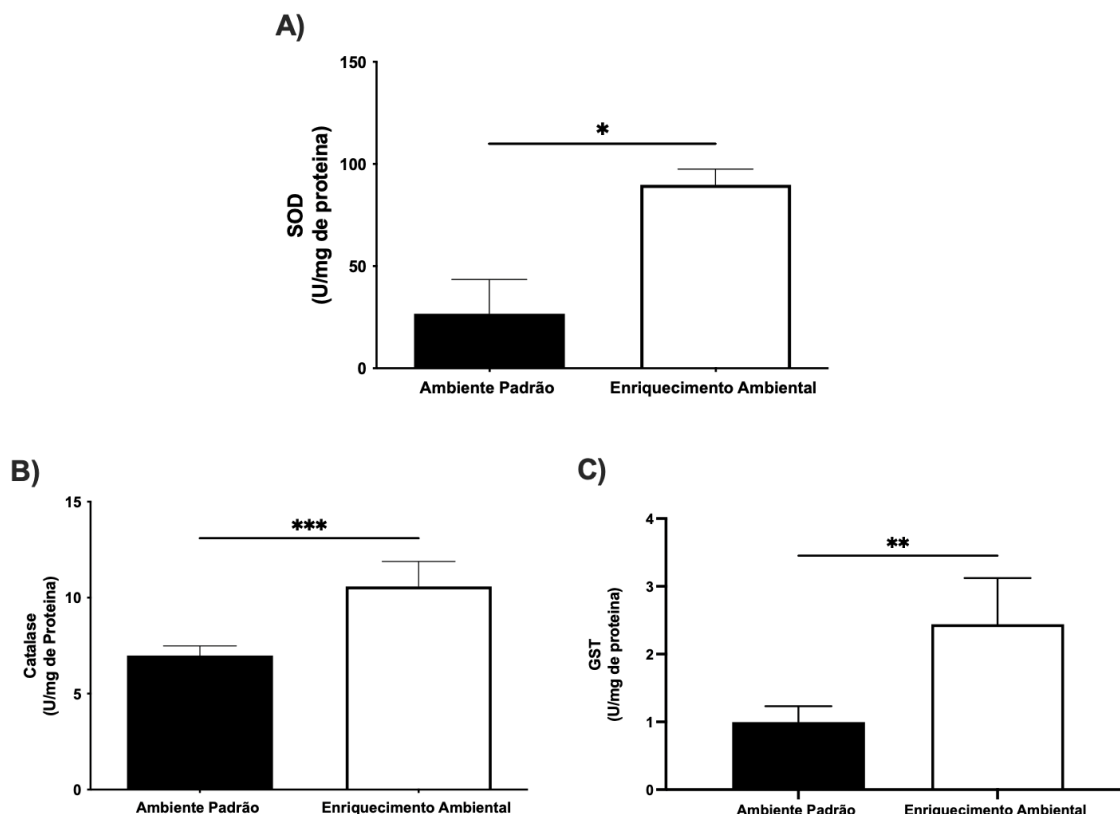


Figura 4. Efeitos do EA sobre atividade antioxidante enzimática hepática de SOD; Catalase e GST. (A) SOD (EA:n=6 e AP: n=3); (B) Catalase (EA:n=6 e AP: n=3); (C) GST (EA:n=6 e AP: n=3); ***p<0.001; **p<0.01; *p<0.05.

7.4 Respostas de três semanas de EA em marcadores ligados a defesas antioxidantes não enzimáticas hepáticas: GSSG, GSH, Estado REDOX.

Em seguida, investigamos no fígado as respostas de três semanas de EA em marcadores ligados a defesas antioxidantes não enzimáticas, como GSSG, GSH e estado REDOX. Primeiramente, nos níveis de GSSG observamos uma redução significativa no grupo EA quando comparado aos animais expostos ao AP (AP: $16,27 \pm 0,48$ vs EA: $0,48 \pm 0,39$, $p=0,03$, $\Delta = -97.05\%$), (Figura 5A). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de GSH entre os grupos (AP: $10,82 \pm 2,72$ vs EA: $7,92 \pm 1,92$, $p=0,19$), (Figura 5B). Contudo, no estado REDOX identificamos um aumento significativo na resposta ao EA após três semanas de intervenção quando comparado ao grupo AP (AP: $6,72 \pm 0,83$ vs EA: $30,13 \pm 14,62$, $p=0,04$, $\Delta = 348.36\%$), (Figura 5C).

7.5 Efeitos do Enriquecimento Ambiental sobre os níveis de Sulfidrilas no fígado.

Em seguida, no fígado foram analisados os níveis de Sulfidrilas, onde observamos um aumento significativo nos níveis ao final da intervenção de EA de três semanas quando comparado ao grupo AP (AP: $0,07 \pm 0,01$ vs EA: $0,17 \pm 0,10$, $p=0,01$, $\Delta=42.85\%$), (Figura 5D).

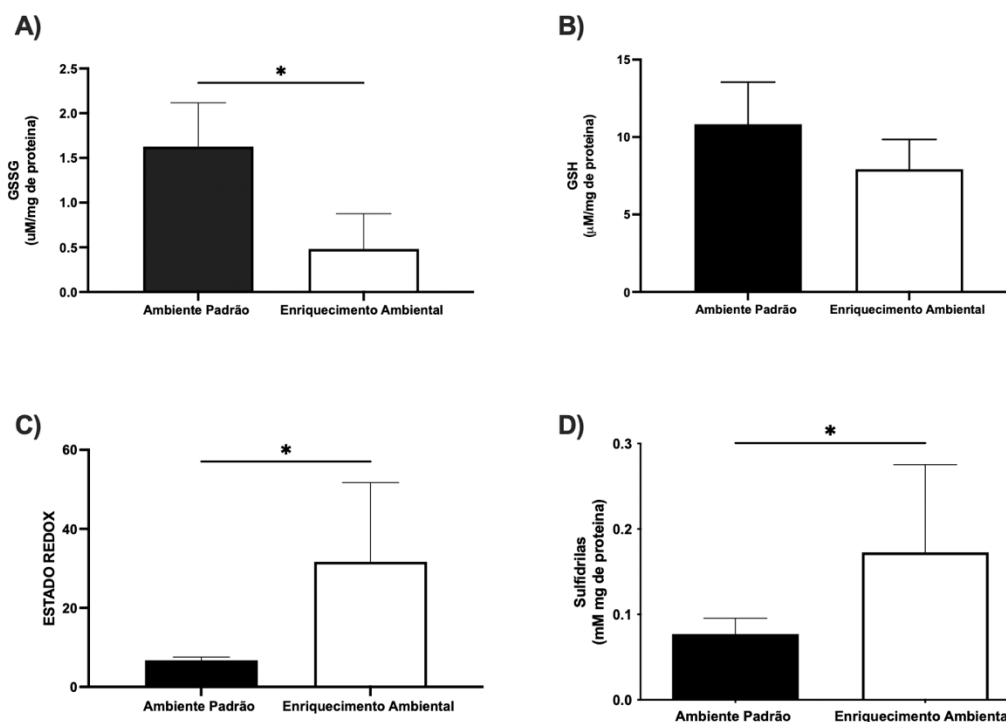


Figura 5. Efeitos do EA sobre marcadores ligados a defesas antioxidantes não enzimáticas e Sulfidrilas no fígado. (A) GSSG (EA:n=7 e AP: n=3); (B) GSH (EA:n=7 e AP: n=3); (C) Estado REDOX (EA:n=6 e AP: n=3) e (D) Sulfidrilas (EA:n=7 e AP: n=3); * $p<0.05$.

7.6 Efeitos de três semanas do EA sobre indicadores de Estresse Oxidativo (Malonaldeído/MDA e Carbonilas) no músculo esquelético.

Em seguida, foi avaliado os indicadores de estresse oxidativo no músculo sóleo. Nós observamos, uma diminuição significativa nos níveis de malonaldeído quando comparado ao grupo AP (AP: $28,91 \pm 7,16$ vs EA: $10,81 \pm 5,70$, $p=0,02$), (Figura 6A). Adicionalmente, ao avaliarmos os níveis de oxidação proteica por carbonilas após três semanas de EA, identificamos uma diminuição significativa em comparação ao grupo AP, (AP: $1,12 \pm 0,12$ vs EA: $0,81 \pm 0,27$, $p=0,0002$), (Figura 6B).

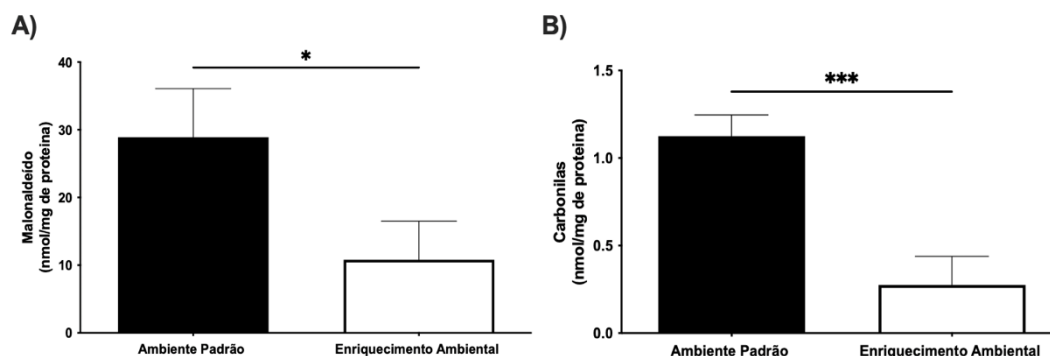


Figura 6. Efeitos do EA sobre marcadores de Estresse Oxidativo no músculo esquelético. (A) MDA (EA:n=6 e AP: n=3); (B) Carbonilas (EA:n=7 e AP: n=3) *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$.

7.7 Efeitos do Enriquecimento Ambiental sobre defesas Antioxidantes Enzimáticas no Sóleo (SOD, Catalase, GST)

No músculo sóleo obtivemos resultados semelhantes aos encontrados na resposta hepática, observamos que o EA foi capaz de aumentar a atividade da SOD (AP: $41,83 \pm 18,88$ vs EA: $91,00 \pm 33,98$, $p=0,02$, $\Delta= 117.54\%$), (Figura 7A), também apresentou um aumento na atividade da catalase (AP: $5,73 \pm 2,23$ vs EA: $11,44 \pm 1,62$, $p=0,02$, $\Delta= 99.65\%$), (Figura 7B) e foi observado um aumento da atividade de GST no músculo esquelético (AP: $0,35 \pm 0,06$ vs EA: $0,61 \pm 0,11$, $p=0,002$, $\Delta= 74.28\%$), (Figura 7C) após três semanas de intervenção quando comparado ao grupo AP.

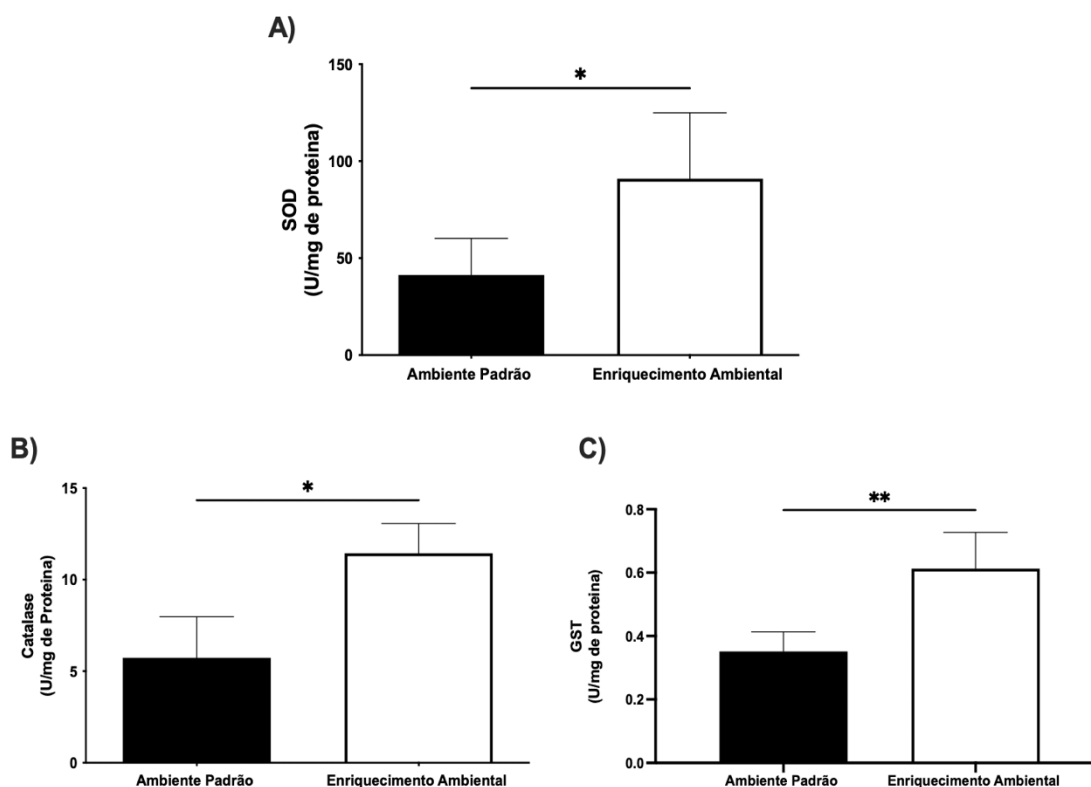


Figura 7. Efeitos do EA sobre atividade antioxidante enzimática no músculo esquelético/sóleo (SOD, Catalase, GST). (A) SOD (EA:n=6 e AP: n=3); (B) Catalase (EA:n=6 e AP: n=3); (C) GST (EA:n=7 e AP: n=3); **p<0.01; *p<0.05.

7.8 Respostas de três semanas de EA em marcadores ligados a defesas antioxidantes não enzimáticas no músculo esquelético: GSSG, GSH, Estado REDOX.

No sóleo, foi observado apenas uma diminuição significativa nos níveis de GSSG quando comparado aos grupos AP (AP: $0,16 \pm 0,01$ vs EA: $0,10 \pm 0,04$, $p=0,01$, $\Delta = -37.50\%$), (Figura 8A). Nas demais variáveis do sistema GSH antioxidante não enzimático (AP: $14,20 \pm 1,79$ vs EA: $10,76 \pm 1,96$, $p=0,01$), (Figura 8B), estado REDOX (AP: $86,40 \pm 4,83$ vs EA: $113,5 \pm 48,86$, $p=0,23$), (Figura 8C) não houve diferenças entre os grupos.

7.9 Efeitos do Enriquecimento Ambiental sobre os níveis de Sulfidrilas no músculo esquelético (sóleo).

Foram avaliados os níveis de Sulfidrilas. Três semanas de EA foi capaz de observar que não houve diferenças entre os grupos Ambiente Padrão e enriquecido (AP: $0,24 \pm 0,17$ vs EA: $0,27 \pm 0,09$, $p=0,62$), (Figura 8D).

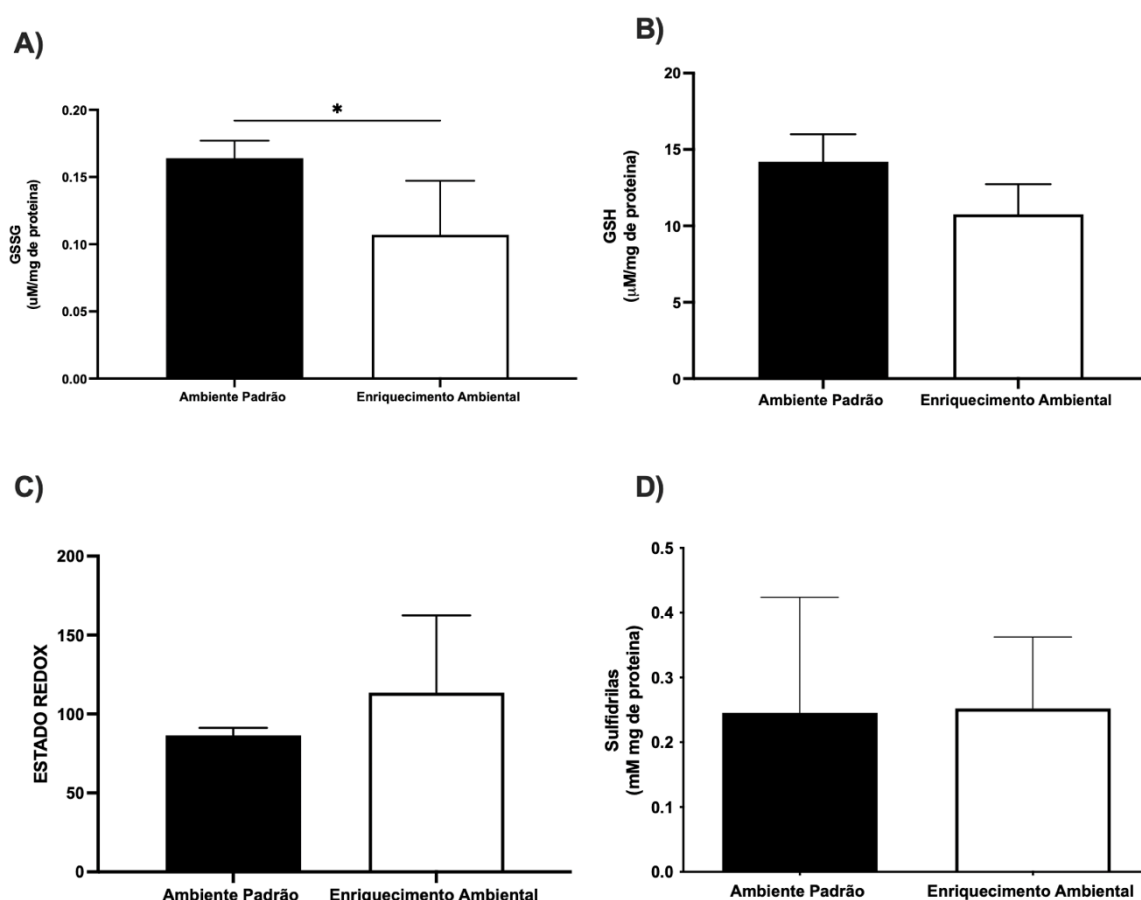


Figura 8. Efeitos do EA sobre marcadores ligados a defesas antioxidantes não enzimáticas e Sulfidrilas no músculo esquelético. (A) GSSG (EA:n=6 e AP: n=3); (B) GSH (EA:n=6 e AP: n=3); (C) Estado REDOX (EA:n=6 e AP: n=3) e (D) Sulfidrilas (EA:n=7 e AP: n=3); *p<0.05.

8. Níveis séricos de citocinas anti-inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2 após três semanas de Enriquecimento Ambiental.

Observamos os níveis séricos de citocinas anti-inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2 após três semanas de EA. Em relação às citocinas anti-inflamatórias, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de IL-2 (AP: $12,20 \pm 0,08$ vs EA: $12,48 \pm 0,47$, $p=0,60$), (Figura 9A), IL-4 (AP: $12,37 \pm 0,22$). versus EA: $12,45 \pm 0,44$, $p=0,74$), (Figura 9B) e IL-10 (AP: $21,37 \pm 1,99$ vs EA: $21,49 \pm 2,77$, $p=0,87$), (Figura 9C) após três semanas de EA.

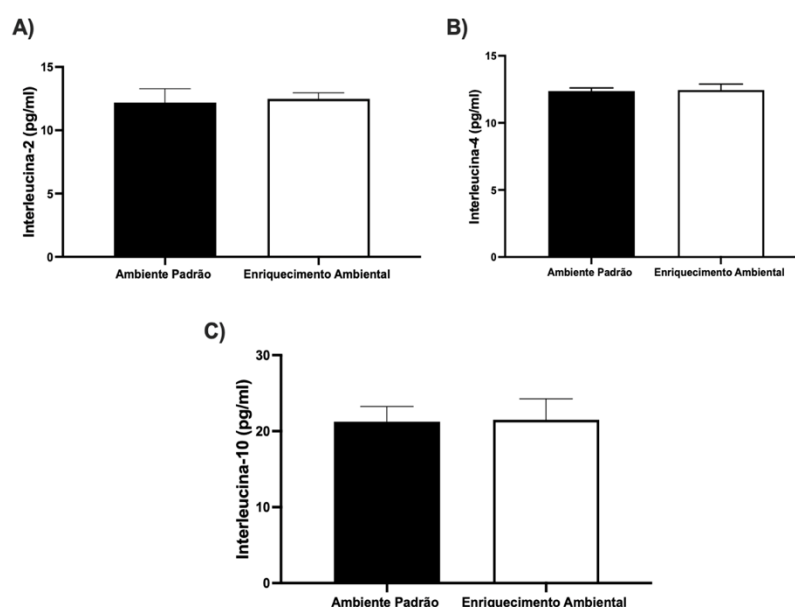


Figura 9. Efeitos do EA sobre níveis séricos de citocinas anti-inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2 após três semanas de Enriquecimento Ambiental. (A) IL-2 (EA:n=5 e AP: n=5); (B) IL-4 (EA:n=5 e AP: n=5); (C) IL-10 (EA:n=5 e AP: n=5).

8.1 Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2 após três semanas de Enriquecimento Ambiental.

Também foram analisados após três semanas de enriquecimento ambiental os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2. Com isso, observamos que três semanas de EA foram capazes de reduzir significativamente os níveis de IL-6, quando comparado ao grupo AP (AP: $13,79 \pm 0,68$ vs EA: $12,53 \pm 0,58$, $p=0,03$, $\Delta = -9.13$), (Figura 10A). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de IL-17 A (AP: $12,16 \pm 1,79$ vs EA: $11,55 \pm 0,60$, $p=0,50$), (Figura 10B), IFN- γ (AP: $12,88 \pm 0,77$ vs. EA: $12,65 \pm 0,69$, $p=0,63$), (Figura 10C) e TNF- α (AP: $24,71 \pm 1,72$ vs EA: $24,29 \pm 3,01$, $p=0,79$), (Figura 10D) após três semanas de EA.

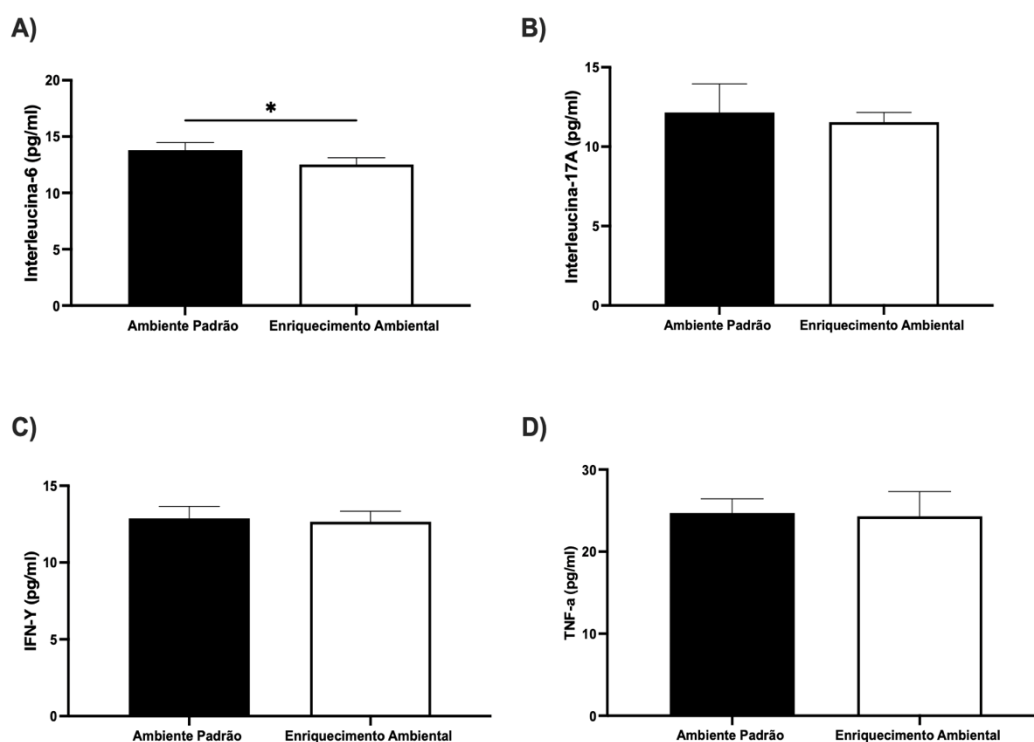


Figura 10. Efeitos do EA sobre níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2 após três semanas de enriquecimento ambiental. A) IL-6 (EA:n=4 e AP: n=4); (B) IL-17A (EA:n=5 e AP: n=5); (C) IFN- γ ; (D) TNF- α (EA:n=5 e AP: n=5).

8.2 Cálculo do tamanho do efeito produzido pelo enriquecimento ambiental em variáveis ligadas ao balanço oxidativo hepático e muscular, bem como níveis de citocinas séricas em camundongos fêmeas

Por seguinte, nos avaliamos o tamanho do efeito produzido pelo enriquecimento ambiental nas variáveis de peso corporal, balanço oxidativo hepático e muscular, bem como na produção de citocinas séricas (Tabelas 1-3). Os valores acima de 0,8 possuíram grande magnitude de efeito.

Tabela 1. Tamanho do efeito produzido por três semanas de EA no peso corporal e balanço oxidativo hepático.

Variável	Ambiente Padrão	Enriquecimento Ambiental	<i>Hedges'g</i>
Peso corporal (Baseline)	16,23 ± 5,30	16,62 ± 5,81	0,068
Peso corporal semana 1	18,00 ± 3,97	19,23 ± 2,52	0,41
Peso corporal semana 2	18,36 ± 1,12	23,38 ± 3,38	1,68
Peso corporal semana 3	20,67 ± 1,03	19,36 ± 1,28	1,07
Níveis de MDA	95,77 ± 27,08	20,19 ± 11,14	4,54
Níveis de Carbonilas	1,55 ± 0,09	1,36 ± 0,11	1,80
Níveis de SOD	26,16 ± 16,80	89,83 ± 7,67	5,94
Níveis de CAT	6,98 ± 0,49	10,58 ± 1,30	3,12
Níveis de GST	0,99 ± 0,23	2,61 ± 0,59	3,09
Níveis de GSSG	1,62 ± 0,48	0,48 ± 0,39	2,75
Níveis de GSH	10,82 ± 2,72	7,92 ± 1,92	1,32
Estado Redox	6,72 ± 0,83	30,13 ± 14,62	1,84
Níveis de Sulfidrilas	0,07 ± 0,01	0,17 ± 0,10	1,15

Legenda: MDA (Malonaldeído); SOD (Superóxido Dismutase); CAT (Catalase); GST (Glutathione S Transferase); GSSG (Glutathione oxidada); GSH (Glutathione reduzida).

Tabela 2. Tamanho do efeito produzido por três semanas de EA balanço oxidativo no musculo esquelético.

Variável	Ambiente Padrão	Enriquecimento Ambiental	<i>Hedges'g</i>
Níveis de MDA	28,91 ±7,16	10,81 ± 5,70	2,96
Níveis de Carbonilas	1,12 ±0,12	0,81 ± 0,27	1,28
Níveis de SOD	41,83 ±18,88	91,00 ± 33,98	1,59
Níveis de CAT	5,73 ± 2,23	11,44 ± 1,62	3,18
Níveis de GST	0,35 ±0,06	0,61 ± 0,11	3,60
Níveis de GSSG	0,16 ±0,01	0,10 ± 0,04	1,71
Níveis de GSH	14,20 ±1,79	10,76 ± 1,96	1,79
Estado Redox	86,40 ±4,83	113,5 ± 48,86	0,63
Níveis de Sulfidrilas	0,24 ±0,17	0,27 ± 0,09	0,26

Legenda: MDA (Malonaldeído); SOD (Superóxido Dismutase); CAT (Catalase); GST (Glutathione S Transferase); GSSG (Glutathione oxidada); GSH (Glutathione reduzida).

Tabela 3. Tamanho do efeito produzido por três semanas de EA em níveis séricos de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2

Variável	Ambiente Padrão	Enriquecimento Ambiental	<i>Hedges'g</i>
Níveis de IL-2	12,20 ± 0,08	12,48 ± 0,47	0,68
Níveis de IL-4	12,37 ± 0,22	12,45 ± 0,44	0,20
Níveis de IL-10	21,37 ± 1,99	21,49 ± 2,77	0,04
Níveis de IL-6	13,79 ± 0,68	12,53 ± 0,58	2,07
Níveis de IL-17A	12,16 ± 1,79	11,55 ± 0,60	0,58
Níveis de IFN- γ	12,88 ± 0,77	12,65 ± 0,69	0,32
Níveis de TNF- α	24,71 ± 1,72	24,29 ± 3,01	0,15

Legenda: IL (Interleucina); IFN- γ (Interferon Gama); TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa).

9. DISCUSSÃO

A presente dissertação teve como objetivo avaliar os efeitos de três semanas do enriquecimento ambiental no balanço oxidativo hepático e muscular, bem como na resposta inflamatória sérica de camundongos fêmeas juvenis. Os nossos resultados demonstram que três semanas de exposição ao EA foi capaz de modular positivamente o peso corporal, bem como também, reduziu indicadores relacionados a peroxidação lipídica e oxidativa proteica hepática e muscular esquelética. Ademais, observamos que a exposição a tal ferramenta não farmacológica foi responsável por potencializar a atividade/níveis das defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas hepáticas e musculares. Bem como também modulou a níveis séricos de interleucina-6.

Inicialmente nossos dados demonstraram que em três semanas o EA foi capaz de reduzir o peso corporal de camundongos, sendo este parâmetro um importante indicador de saúde. Com isso, nossos resultados apontam que o EA foi capaz de reduzir o peso corporal dentro do período de três semanas de enriquecimento. Evidências demonstram, que a utilização do EA é capaz de regular positivamente o bem-estar, promovendo efeitos positivos em condições corporais em diferentes modelos animais incluindo roedores (Ishiwari, et al. 2024). Com isso, a redução de peso corporal que observamos pode ter sido ocasionada por diversos mecanismos, dentre eles o aumento na eficiência do metabolismo oxidativo, principalmente através do aumento da atividade locomotora voluntária. Essa atividade de locomoção, atua na promoção de estímulos aeróbios, que servem de gatilho para processos mitocondriais incluindo a beta-oxidação, que por sua vez potencializa lipogênese, contribuindo para redução da adiposidade e melhor controle do peso corporal (Muscella, et al. 2020)

Em seguida, analisamos no fígado e no sóleo os níveis de MDA e Carbonilas, bem como as defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Nos marcadores de estresse oxidativo em ambos os tecidos, fomos capazes de identificar que três semanas de EA foi capaz de reduzir os níveis de peroxidação lipídica e oxidação proteica, podendo indicar uma redução efetiva do estresse oxidativo. Sabe-se que a redução significativa nos níveis desses compostos e processos, fornece ao organismo um estado oxidativo mais equilibrado (Prado Lima, et al. 2018). Por outro lado, o desequilíbrio no balanço oxidativo culminando em danos efetivos em macromoléculas constituintes da membrana plasmática, incluindo lipídeos e proteínas. Esses danos, se alastram e podem causar a morte celular programada. Adicionalmente, o estresse

oxidativo está presente na fisiopatologia de várias doenças, desde cardiovasculares e neurodegenerativas (Guo, et al. 2013). Para combate para tais condições, recomenda-se a redução nos níveis de fatores que geram estresse, um aumento das defesas antioxidantes é observado (Prevedello and Comachio 2021). Neste sentido, nossos dados corroboram os dados da literatura, e apontam que o EA durante três semanas foi efetivo no aumento da atividade das defesas antioxidantes enzimáticas no fígado e no músculo sóleo. Observamos também no fígado um aumento significativo nos níveis de SOD, catalase e GST, o que sugere que o EA, pode ser uma ferramenta não farmacológica eficaz para mitigar o estresse oxidativo. O estudo de Cezar et. al. (2019) encontrou um resultado semelhante, onde o enriquecimento ambiental em ratos hipertensos, foi capaz de aumentar os níveis das defesas antioxidantes enzimáticas SOD e CAT no bulbo ventrolateral, assim, corroborando que o EA tem efeito protetor contra o estresse oxidativo em diferentes tecidos.

O sistema antioxidante não enzimático desempenha um grande papel quanto ao combate de danos oxidativos, agindo diretamente na neutralização de espécies reativas de oxigênio, protegendo assim, lipídeos, proteínas e o DNA contra danos que podem acometê-los (Velloso, et al. 2021). Observamos que o EA foi capaz de reduzir os níveis de GSSG tanto no fígado como no músculo esquelético de camundongos fêmeas. Em ambos os tecidos, não houve diferença em níveis de GSH. No fígado foi visto um aumento no estado REDOX e de Sulfidrila. Já no músculo não foram observadas diferenças significativas. Contudo, estudos recentes demonstram que o EA é capaz de melhorar o metabolismo oxidativo e regular níveis pressóricos em ratos juvenis, e essa redução faz com que haja um impacto direto na modulação e estabilização do estresse oxidativo sistêmico, afetando também demais órgãos (Sousa, et al. 2019).

Para compreendermos melhor a efetividade do EA, observamos os efeitos de três semanas de protocolo para análise de níveis séricos de citocinas anti e pró inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2. Visto que as células T auxiliares (Th) desempenham um papel crucial na resposta imunológica adaptativa, se diferenciando entre dois perfis Th1 e Th2. Já que cada perfil está associado a diferentes produções de citocinas influenciando diretamente na resposta imune, um equilíbrio entre ambos os perfis é necessário para que haja a homeostase imunológica. Um desequilíbrio pode estar diretamente ligado a diversas condições patológicas que casem distúrbios no organismo (Chen and Wang 2022). Com isso, nosso estudo foi capaz de avaliar no sangue de camundongos fêmeas citocinas ligadas a esses

perfis IL-2, IL-4, e IL-10, onde em relação às citocinas anti-inflamatórias, não foram encontradas diferenças significativas em seus níveis após três semanas de enriquecimento. Esses resultados podem ser associados ao tempo de enriquecimento ambiental, visto que o tempo de exposição a ferramenta foi de três semanas, necessitando assim de estudos futuros para que possa ser comparado o tempo de enriquecimento com a expressão de citocinas anti-inflamatórias.

Por fim, mas não menos importante. Avaliamos também os níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias ligadas ao perfil Th1/Th2. Onde observamos que os nossos dados demonstraram uma redução nos níveis de IL-6 após três semanas de enriquecimento ambiental, o que aponta que pode haver uma melhora na condição metabólica dos indivíduos, podendo estar ligada a perda de peso, já que níveis aumentados de IL-6 podem estar associados a diferentes graus e condições de obesidade. Além também dessa redução estar associada a um menor risco de complicações cardiovasculares, já que EA aumenta a capacidade locomotora e exploratória, modulando positivamente parâmetros hemodinâmicos. Um aumento de IL-6 a níveis séricos está associado a doenças cardiovasculares como aterosclerose e infarto do miocárdio (Mehta, et al. 2024). Níveis elevados de IL-6 podem contribuir para inflamações crônicas das artérias e dor crônica. (Lin, et al. 2023)

10. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Dentre as limitações do presente estudo, destacamos a necessidade de aumentarmos o número de animais na análise de citocinas séricas. Isso, seria fundamental para visualização de diferenças significantes e efeitos produzidos pelo enriquecimento ambiental. Portanto, pesquisas futuras podem analisar exposições por períodos mais extensos, com o objetivo de comparar e elucidar os resultados alcançados. Adicionalmente, se faz necessário avaliar os níveis de expressão gênica de marcadores ligados a resposta inflamatória nestes tecidos, deste modo contemplando um maior espectro de análises após essa ferramenta não farmacológica.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Três semanas de Enriquecimento Ambiental foi capaz de reduzir os níveis de marcadores ligados ao estresse oxidativo, bem como também aumentou os níveis das defesas antioxidantes enzimáticas hepática e muscular esquelética. Além disso, observamos no fígado aumento no estado REDOX, bem como nos níveis de sulfidrila, o que fomenta uma melhor resposta antioxidante não enzimática. No sêro houve redução nos níveis de GSSG. Por fim, identificamos que o EA foi capaz de reduzir

significativamente o nível sérico de Interleucina-6 em camundongos fêmeas. Esses resultados apontam para possibilidade da utilização do EA não farmacológica, viável e de baixo custo em condições fisiológicas.

REFERÊNCIAS

- Battineni, Gopi, et al. 2021 Impact of obesity-induced inflammation on cardiovascular diseases (CVD). *International Journal of Molecular Sciences* 22(9):4798.
- Orfali, Razan, et al. 2024 Oxidative stress and ion channels in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Physiology* 15:1320086.
- Afzal, Sheryar, et al. 2023 From imbalance to impairment: the central role of reactive oxygen species in oxidative stress-induced disorders and therapeutic exploration. *Frontiers in Pharmacology* Volume 14 - 2023.
- Mohd Sahini, Siti Norhafizah, et al. 2024 Environmental enrichment improves cognitive function, learning, memory and anxiety-related behaviours in rodent models of dementia: Implications for future study. *Neurobiology of Learning and Memory* 208:107880.
- Fernandes, M. S. S., et al. 2023 Environmental Enrichment in Cancer as a Possible Tool to Combat Tumor Development: A Systematic Review. *Int J Mol Sci* 24(22).
- Ramos, Tiago Lacerda, et al. 2024 The impact of enriched environments on cerebral oxidative balance in rodents: a systematic review of environmental variability effects. *Frontiers in Neuroscience* 18.
- Hebb, Donald O 1947 The effects of early experience on problem-solving at maturity. *American Psychologist* 2:306-307.
- de Sousa Fernandes, Matheus Santos, et al. 2022 Cytokines and immune cells profile in different tissues of rodents induced by environmental enrichment: systematic review. *International journal of molecular sciences* 23(19):11986.
- de Sousa Fernandes, Matheus Santos, et al. 2024 Can Environmental Enrichment Modulate Epigenetic Processes in the Central Nervous System Under Adverse Environmental Conditions? A Systematic Review. *Cellular and Molecular Neurobiology* 44(1):69.
- Xiao, R., et al. 2021 Enhancing Effects of Environmental Enrichment on the Functions of Natural Killer Cells in Mice. *Front Immunol* 12:695859.
- Ampong, Isaac, et al. 2022 Maternal obesity alters offspring liver and skeletal muscle metabolism in early post-puberty despite maintaining a normal post-weaning dietary lifestyle. *The FASEB Journal* 36(12).
- Sano, Akitoshi, et al. 2024 Type 2 Diabetes Mellitus is a Risk Factor for Skeletal Muscle Loss in the Course of Dietary Treatment for Patients with Metabolic Dysfunction-associated Steatotic Liver Disease. *Internal Medicine*:3787-24.
- Mantovani, Alberto, and Cecilia Garlanda 2023 Humoral innate immunity and acute-phase proteins. *New England Journal of Medicine* 388(5):439-452.
- Parkin, Jacqueline, and Bryony Cohen 2001 An overview of the immune system. *The Lancet* 357(9270):1777-1789.
- Chi, H., M. Pepper, and P. G. Thomas 2024 Principles and therapeutic applications of adaptive immunity. *Cell* 187(9):2052-2078.

- Costa, S., et al. 2019 Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes *Immunology* 156(1):23-32.
- Tadayon, Sina, et al. 2021 Lymphatic Endothelial Cell Activation and Dendritic Cell Transmigration Is Modified by Genetic Deletion of Clec4e-1. *Frontiers in Immunology* 12.
- Hampton, Henry R., and Tatyana Chtanova 2019 Lymphatic Migration of Immune Cells. *Frontiers in Immunology* 10.
- Arango Duque, G., and A. Descoteaux 2014 Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol* 5:491.
- Rahman, Tanjilur, et al. 2023 Cytokines and their role as immunotherapeutics and vaccine Adjuvants: The emerging concepts. *Cytokine* 169:156268.
- Tecchio, Cristina, Alessandra Micheletti, and Marco A. Cassatella 2014 Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Frontiers in Immunology* 5.
- Hutchins, A. P., D. Diez, and D. Miranda-Saavedra 2013 The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. *Brief Funct Genomics* 12(6):489-98.
- Popko, K., et al. 2010 Proinflammatory cytokines Il-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects. *Eur J Med Res* 15 Suppl 2(Suppl 2):120-2.
- Fahey, Erin, and Sarah L. Doyle 2019 IL-1 Family Cytokine Regulation of Vascular Permeability and Angiogenesis. *Frontiers in Immunology* 10.
- Loh, Waywen, and Sonja Vermeren 2022 Anti-Inflammatory Neutrophil Functions in the Resolution of Inflammation and Tissue Repair. *Cells* 11(24):4076.
- Fritsche, Kristin, et al. 2023 Metabolism-Disrupting Chemicals Affecting the Liver: Screening, Testing, and Molecular Pathway Identification. *International Journal of Molecular Sciences* 24(3):2686.
- Gong, J., et al. 2022 Hepatocytes: A key role in liver inflammation. *Front Immunol* 13:1083780.
- Chong Neto, Herberto, et al. 2019 A microbiota intestinal e sua interface com o sistema imunológico. *Brazilian Journal of Allergy and Immunology (BJAI)* 3.
- Jiang, Yizhi, et al. 2021 Kupffer cell receptor CLEC4F is important for the destruction of desialylated platelets in mice. *Cell Death & Differentiation* 28(11):3009-3021.
- Kubes, P., and C. Jenne 2018 Immune Responses in the Liver. *Annu Rev Immunol* 36:247-277.
- Hurley, T. D., and H. J. Edenberg 2012 Genes encoding enzymes involved in ethanol metabolism. *Alcohol Res* 34(3):339-44.
- Chidiac, Annabelle S., et al. 2023 Paracetamol (acetaminophen) overdose and hepatotoxicity: mechanism, treatment, prevention measures, and estimates of burden of disease. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 19(5):297-317.
- Schulze, R. J., et al. 2019 The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *J Cell Biol* 218(7):2096-2112.
- Robinson, Mark W, Cathal Harmon, and Cliona O'Farrelly 2016 Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cellular & molecular immunology* 13(3):267-276.

Luz, José Hugo Mendes, et al. 2021 BestFLR Trial: Liver regeneration at CT before major hepatectomies for liver cancer—A randomized controlled trial comparing portal vein embolization with N-butyl-cyanoacrylate plus iodized oil versus polyvinyl alcohol particles plus coils. *Radiology* 299(3):715-724.

Mashek, D. G. 2013 Hepatic fatty acid trafficking: multiple forks in the road. *Adv Nutr* 4(6):697-710.

Peng, Tao, et al. 2023 Bile dynamics within the biliary tract and microfluidic-based bile component detection: A review. *arXiv preprint arXiv:2311.13117*.

Spatz, Madeleine, et al. 2021 Bile acid-receptor TGR5 deficiency worsens liver injury in alcohol-fed mice by inducing intestinal microbiota dysbiosis. *JHEP Reports* 3(2):100230.

Gao, Hong, et al. 2022 MiR-690 treatment causes decreased fibrosis and steatosis and restores specific Kupffer cell functions in NASH. *Cell metabolism* 34(7):978-990. e4.

Nagashimada, Mayumi, and Tsuguhito Ota 2019 Role of vitamin E in nonalcoholic fatty liver disease. *IUBMB life* 71(4):516-522.

Grüngreiff, Kurt, et al. 2021 Albumin substitution in decompensated liver cirrhosis: don't forget zinc. *Nutrients* 13(11):4011.

Bonnardel, Johnny, et al. 2019 Stellate cells, hepatocytes, and endothelial cells imprint the Kupffer cell identity on monocytes colonizing the liver macrophage niche. *Immunity* 51(4):638-654. e9.

Sakai, Mashito, et al. 2019 Liver-derived signals sequentially reprogram myeloid enhancers to initiate and maintain Kupffer cell identity. *Immunity* 51(4):655-670. e8.

Li, Xiaoyu, et al. 2024 Mitochondrial homeostasis: shaping health and disease. *Current Medicine* 3(1):5.

Noronha, Carolina Mendonça, Francisca Marta Nascimento de Oliveira Freitas, and José Carlos de Sales Ferreira 2022 Nutritional strategies in mitochondrial biogenesis and the performance effects of energy pathways for the Endurance athlete.

Kehrer, J. P., and L. O. Klotz 2015 Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. *Crit Rev Toxicol* 45(9):765-98.

Sies, Helmut 2015 Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology* 4:180-183.

Murphy, Michael P., et al. 2022 Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism* 4(6):651-662.

Jones, Dean P 2008 Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 295(4):C849-C868.

Jomova, Klaudia, et al. 2023 Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: Chronic diseases and aging. *Archives of toxicology* 97(10):2499-2574.

Chandimali, Nisansala, et al. 2025 Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discovery* 11(1):19.

Finkel, Toren, and Nikki J Holbrook 2000 Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *nature* 408(6809):239-247.

- Liu, Yanqing, Quanlu Duan, and Liping Peng 2023 Editorial: Oxidative stress and distinct cell death. *Frontiers in Physiology* 14.
- Senoner, Thomas, and Wolfgang Dichtl 2019 Oxidative stress in cardiovascular diseases: still a therapeutic target? *Nutrients* 11(9):2090.
- Hall, John E, and Arthur C Guyton 2011 *Tratado de fisiologia médica*. 12. Ed. Rio de JANEIRO: Saunders Elsevier.
- Roberts, Thomas J, et al. 2019 The multi-scale, three-dimensional nature of skeletal muscle contraction. *Physiology* 34(6):402-408.
- Remeniéras, Jean-Pierre, et al. 2021 Acousto-elasticity of transversely isotropic incompressible soft tissues: Characterization of skeletal striated muscle. *Physics in Medicine & Biology* 66(14):145009.
- Caremani, Marco, and Massimo Reconditi 2022 Anisotropic Elasticity of the Myosin Motor in Muscle. *International Journal of Molecular Sciences* 23(5):2566.
- Brooks, Susan V, Steve D Guzman, and Lloyd P Ruiz 2023 Skeletal muscle structure, physiology, and function. *Handbook of Clinical Neurology* 195:3-16.
- Lim, Changhyun, et al. 2022 An Evidence-Based Narrative Review of Mechanisms of Resistance Exercise-Induced Human Skeletal Muscle Hypertrophy. *Medicine and science in sports and exercise* 54(9):1546.
- McCann, Matthew R, et al. 2021 Smooth Muscle Conditions of the Chest: A Clinical, Radiologic, and Pathologic Review. *Journal of Thoracic Imaging* 36(5):263-278.
- Sayers, Judy R, and Paul R Riley 2021 Heart regeneration: beyond new muscle and vessels. *Cardiovascular research* 117(3):727-742.
- Leonard, Kaitlyn C, et al. 2020 The ontogeny of masticatory muscle architecture in *Microcebus murinus*. *The Anatomical Record* 303(5):1364-1373.
- Yin, Hang, Feodor Price, and Michael A Rudnicki 2013 Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiological reviews* 93(1):23-67.
- Dumont, Nicolas A, et al. 2015 Satellite cells and skeletal muscle regeneration. *Compr Physiol* 5(3):1027-1059.
- Montarras, Didier, et al. 2005 Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 309(5743):2064-2067.
- Centner, Christoph, et al. 2019 Effects of blood flow restriction training on muscular strength and hypertrophy in older individuals: a systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine* 49:95-108.
- Pignanelli, Christopher, Danny Christiansen, and Jamie F Burr 2021 Blood flow restriction training and the high-performance athlete: science to application. *Journal of Applied Physiology*.
- Singhal, Gaurav, et al. 2014 Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:97.
- Kempermann, Gerd 2019 Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nature Reviews Neuroscience* 20(4):235-245.
- Nik Ramli, N. N., et al. 2024 Restricted Daily Exposure of Environmental Enrichment: Bridging the Practical Gap from Animal Studies to Human Application. *Int J Environ Res Public Health* 21(12).

- Lauderdale, Lisa K., et al. 2022 Environmental Enrichment Factors Associated with the Activity Level of Bottlenose Dolphins under Professional Care. *Journal of Zoological and Botanical Gardens* 3(1):44-55.
- Caselli, Marta, et al. 2022 Enriching zoo-housed ring-tailed lemurs (*Lemur catta*): Assessing the influence of three types of environmental enrichment on behavior. *Animals* 12(20):2836.
- Aleyasin, Hossein, Meghan E Flanigan, and Scott J Russo 2018 Neurocircuitry of aggression and aggression seeking behavior: nose poking into brain circuitry controlling aggression. *Current opinion in neurobiology* 49:184-191.
- Otaki, Momoko, et al. 2018 Changes in the function and phenotype of resident peritoneal macrophages after housing in an enriched environment. *International Immunopharmacology* 65:44-49.
- Bayat, Mahnaz, et al. 2015 Enriched environment improves synaptic plasticity and cognitive deficiency in chronic cerebral hypoperfused rats. *Brain research bulletin* 119:34-40.
- Ishiwari, Keita, et al. 2024 Environmental enrichment promotes adaptive responding during tests of behavioral regulation in male heterogeneous stock rats. *Scientific Reports* 14(1):4182.
- Muscella, Antonella, et al. 2020 The regulation of fat metabolism during aerobic exercise. *Biomolecules* 10(12):1699.
- Prado Lima, Mariza G., et al. 2018 Environmental enrichment and exercise are better than social enrichment to reduce memory deficits in amyloid beta neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(10):E2403-E2409.
- Guo, C., et al. 2013 Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res* 8(21):2003-14.
- Prevedello, MT, and G Comachio 2021 Antioxidants and their relationship with free radicals, and Chronic Non communicable Diseases: a literature review. *Braz J Develop* 7(6):55244-55285.
- Cezar, M. D. M., et al. (2019). Environmental enrichment effect on oxidative stress in hypertensive rats, *SciELO Brasil*. 113: 913-914.
- Velloso, José Carlos Rebuglio, et al. 2021 Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte / Oxidative stress: an introduction to the state of art. *Brazilian Journal of Development* 7(1):10152-10168.
- Sousa, Luiz Eduardo, et al. 2019 Environmental enrichment promotes antioxidant effect in the ventrolateral medulla and kidney of renovascular hypertensive rats. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 113:905-912.
- Chen, Liang, and Jun Wang 2022 Gut microbiota and inflammatory bowel disease. *WIREs Mechanisms of Disease* 14(2):e1540.
- Mehta, N. N., E. de Goma, and M. D. Shapiro 2024 IL-6 and Cardiovascular Risk: A Narrative Review. *Curr Atheroscler Rep* 27(1):12.
- Lin, Ding, et al. 2023 Serum interleukin-6 levels are increased in post-herpetic neuralgia: a single-center retrospective study. *Anais brasileiros de dermatologia* 98(2):202-207.

ANEXOS

PRODUÇÕES DURANTE O MESTRADO

1. The impact of enriched environments on cerebral oxidative balance in rodents: a systematic review of environmental variability effects.

<https://www.frontiersin.org/journals/neuroscience/articles/10.3389/fnins.2024.1366747/full>

 frontiers | Frontiers in Neuroscience

TYPE Systematic Review
PUBLISHED 11 April 2024
DOI 10.3389/fnins.2024.1366747



OPEN ACCESS

EDITED BY
Adriana Ximenes-da-Silva,
Federal University of Alagoas, Brazil

REVIEWED BY
Sidra Tabassum,
University of Texas Health Science Center at
Houston, United States
Pankaj Bhatta,
Wayne State University, United States

*CORRESPONDENCE
Georgian Badicu
✉ georgian.badicu@unitbv.ro
Fatma Hilal Yagin
✉ hilal.yagin@inonu.edu.tr
Burak Yagin
✉ burak.yagin@inonu.edu.tr
Fabricio Oliveira Souto
✉ fabricio.souto@ufpe.br

[†]These authors have contributed equally to
this work

RECEIVED 07 January 2024
ACCEPTED 19 March 2024
PUBLISHED 11 April 2024

CITATION
Ramos TL, de Sousa Fernandes MS,
da Silva Fidélis DE, Jurema Santos GC,
Albuquerque RB, Ferreira DJS, de Souza RF,
Badicu G, Yagin FH, Yagin B,
Alwhaibi RM, Souto FO and
Lagranha CJ (2024) The impact of enriched
environments on cerebral oxidative balance
in rodents: a systematic review of
environmental variability effects.
Front. Neurosci. 18:1366747.
doi: 10.3389/fnins.2024.1366747

COPYRIGHT
© 2024 Ramos, de Sousa Fernandes,
da Silva Fidélis, Jurema Santos, Albuquerque,
Ferreira, de Souza, Badicu, Yagin, Yagin,
Alwhaibi, Souto and Lagranha. This is an
open-access article distributed under the
terms of the [Creative Commons Attribution
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or
reproduction in other forums is permitted,
provided the original author(s) and the
copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or reproduction
is permitted which does not comply with
these terms.

The impact of enriched environments on cerebral oxidative balance in rodents: a systematic review of environmental variability effects

Tiago Lacerda Ramos¹, Matheus Santos de Sousa Fernandes^{1,2},
Débora Eduarda da Silva Fidélis¹,
Gabriela Carvalho Jurema Santos³, Renata B. Albuquerque^{1,2},
Diorginis José Soares Ferreira⁴, Raphael Fabrício de Souza⁵,
Georgian Badicu^{6*}, Fatma Hilal Yagin^{7*}, Burak Yagin^{7*},
Reem M. Alwhaibi⁸, Fabricio Oliveira Souto^{1,2,*†} and
Cláudia Jacques Lagranha^{9†}

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, ²Instituto Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, ³Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, ⁴Physical Education Department/Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, Pernambuco, Brazil, ⁵Department of Physical Education, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil, ⁶Department of Physical Education and Special Motricity, Transilvania University of Braşov, Braşov, Romania, ⁷Department of Biostatistics and Medical Informatics, Faculty of Medicine, Inonu University, Malatya, Türkiye, ⁸Department of Rehabilitation Sciences, College of Health and Rehabilitation Sciences, Princess Nourah Bint Abdulrahman University, Riyadh, Saudi Arabia, ⁹Programa de Pós-Graduação em Nutrição Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

Introduction: The present review aimed to systematically summarize the impacts of environmental enrichment (EE) on cerebral oxidative balance in rodents exposed to normal and unfavorable environmental conditions.

Methods: In this systematic review, four databases were used: PubMed (830 articles), Scopus (126 articles), Embase (127 articles), and Science Direct (794 articles). Eligibility criteria were applied based on the Population, Intervention, Comparison, Outcomes, and Study (PICOS) strategy to reduce the risk of bias. The searches were carried out by two independent researchers; in case of disagreement, a third participant was requested. After the selection and inclusion of articles, data related to sample characteristics and the EE protocol (time of exposure to EE, number of animals, and size of the environment) were extracted, as well as data related to brain tissues and biomarkers of oxidative balance, including carbonyls, malondialdehyde, nitrotyrosine, oxygen-reactive species, and glutathione (reduced/oxidized).

Results: A total of 1,877 articles were found in the four databases, of which 16 studies were included in this systematic review. The results showed that different EE protocols were able to produce a global increase in antioxidant capacity, both enzymatic and non-enzymatic, which are the main factors for the neuroprotective effects in the central nervous system (CNS) subjected to unfavorable conditions. Furthermore, it was possible to notice a slowdown in neural dysfunction associated with oxidative damage, especially in the prefrontal structure in mice.

2. Environmental Enrichment in Cancer as a Possible Tool to Combat Tumor Development: A Systematic Review

<https://www.mdpi.com/1422-0067/24/22/16516>



International Journal of
Molecular Sciences



Review

Environmental Enrichment in Cancer as a Possible Tool to Combat Tumor Development: A Systematic Review

Matheus Santos de Sousa Fernandes ^{1,2}, Tiago Ramos Lacerda ², Débora Eduarda da Silva Fidélis ², Gabriela Carvalho Jurema Santos ³, Tayrine Ordonio Filgueira ^{1,2}, Raphael Fabrício de Souza ⁴, Cláudia Jacques Lagranha ⁵, Fábio S. Lira ^{6,7}, Angela Castoldi ^{1,2} and Fabrício Oliveira Souto ^{1,2,8,*}

- ¹ Instituto Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50740-600, Pernambuco, Brazil; matheus.sfernandes@ufpe.br (M.S.d.S.F.); tayrine.ordonio@ufpe.br (T.O.F.); angela.castoldi@gmail.com (A.C.)
- ² Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50740-600, Pernambuco, Brazil; tiago.lacerdar@hotmail.com (T.R.L.); deeborafidelis@hotmail.com (D.E.d.S.F.)
- ³ Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50740-600, Pernambuco, Brazil; gaby9carvalho@gmail.com
- ⁴ Department of Physical Education, Federal University of Sergipe, São Cristóvão 49100-000, Sergipe, Brazil; raphaelctba20@hotmail.com
- ⁵ Programa de Pós-Graduação em Nutrição Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, Centro Acadêmico de Vitória, Vitória de Santo Antão 55608-680, Pernambuco, Brazil; claudia.lagranha@ufpe.br
- ⁶ Exercise and Immunometabolism Research Group, Postgraduate Program in Movement Sciences, Department of Physical Education, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Presidente Prudente 19060-900, São Paulo, Brazil; fabio.lira@unesp.br
- ⁷ Faculty of Sport Science and Physical Education, University of Coimbra, 3000-456 Coimbra, Portugal
- ⁸ Núcleo de Ciências da Vida—NCV, Centro Acadêmico do Agreste—CAA, Caruaru 50670-901, Pernambuco, Brazil
- * Correspondence: fabricio.souto@ufpe.br



Citation: Fernandes, M.S.d.S.; Lacerda, T.R.; Fidélis, D.E.d.S.; Santos, G.C.J.; Filgueira, T.O.; de Souza, R.F.; Lagranha, C.J.; Lira, F.S.; Castoldi, A.; Souto, F.O. Environmental Enrichment in Cancer as a Possible Tool to Combat Tumor Development: A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 16516. <https://doi.org/10.3390/ijms242216516>

Academic Editor: Cristina Peña

Received: 29 September 2023

Revised: 10 November 2023

Accepted: 14 November 2023

Published: 20 November 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: This systematic review aims to evaluate the influence of environmental enrichment (EE) on oncological factors in experimental studies involving various types of cancer models. A comprehensive search was conducted in three databases: PubMed (161 articles), Embase (335 articles), and Scopus (274 articles). Eligibility criteria were applied based on the PICOS strategy to minimize bias. Two independent researchers performed the searches, with a third participant resolving any discrepancies. The selected articles were analyzed, and data regarding sample characteristics and EE protocols were extracted. The outcomes focused solely on cancer and tumor-related parameters, including cancer type, description of the cancer model, angiogenesis, tumor occurrence, volume, weight, mice with tumors, and tumor inhibition rate. A total of 770 articles were identified across the three databases, with 12 studies meeting the inclusion criteria for this systematic review. The findings demonstrated that different EE protocols were effective in significantly reducing various aspects of tumor growth and development, such as angiogenesis, volume, weight, and the number of mice with tumors. Furthermore, EE enhanced the rate of tumor inhibition in mouse cancer models. This systematic review qualitatively demonstrates the impacts of EE protocols on multiple parameters associated with tumor growth and development, including angiogenesis, occurrence, volume, weight, and tumor incidence. Moreover, EE demonstrated the potential to increase the rate of tumor inhibition. These findings underscore the importance of EE as a valuable tool in the management of cancer.

Keywords: enriched environment; cancer; tumor growth; angiogenesis; pro-oncogenic factor

1. Introduction

Environmental enrichment (EE) is an enhanced mental stimulation method that promotes stimuli, developing memory-demanding tasks due to the socio-environmental context where rodents can interact actively with their complex surroundings [1,2]. In this

3. Comment on “The impact of 5-hydroxytryptophan supplementation on sleep quality and gut microbiota composition in older adults: A randomized controlled trial” clinical nutrition 2024

[https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261-5614\(24\)00157-2/fulltext](https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261-5614(24)00157-2/fulltext)

Clinical Nutrition 43 (2024) 1597–1598



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Nutrition

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/cinu>



Letter to the Editor

Comment on “The impact of 5-hydroxytryptophan supplementation on sleep quality and gut microbiota composition in older adults: A randomized controlled trial” clinical nutrition 2024



Keywords:

Serotonin
Elderly
Sleep
Nutrition

Dear Editor,

We congratulate Sutanto et al. [1] on their excellent study, which evaluated the impacts of 5-hydroxytryptophan (5-HTP) supplementation on sleep quality and the composition of the intestinal microbiota in older adults. Firstly, the utilization of participants over 60 years of age caught our attention, given that much of the research related to sleep is typically conducted on adults [1]. This is because the quality of sleep gradually decreases due to morphological and functional changes that occur during the aging process, resulting in a reduced ability to initiate and/or maintain sleep [2]. Next, we were intrigued by the investigation into the impact of 5-HTP supplementation on the composition of the intestinal microbiota, since the drug can potentially act to restore imbalances in this region, including dysbiosis, and can mitigate cognitive impairments caused by sleep deprivation [1,3]. Therefore, we suggest that future investigations delve into the mechanisms underlying the effects of 5-HTP, including biochemical and genetic markers related to sleep and gut health.

The quality and quantity of sleep are closely influenced by both internal and external factors [2]. While the present study utilized psychometric tests to assess the participants' levels of depression and anxiety [1], we overlooked monitoring other potential sleep-disrupting conditions, such as stress and panic disorder. Considering that stressful events are recognized as precipitating factors for insomnia onset [4], we recommend that future research incorporates questionnaires and/or scales – such as the Depression, Anxiety, and Stress Scale (DASS) – capable of evaluating stress levels and exploring others specific aspects of individuals' routines, thus minimizing potential biases in interpretation. Furthermore, studies indicate that the individual or combined use of 5-HTP demonstrates some efficacy in treating disorders like panic, indicating that improvements or deteriorations in sleep quality may result from changes in other psychiatric conditions. Therefore, conducting additional psychometric assessments would enable the

identification of other potential confounding factors, which could also influence sleep patterns positively or negatively.

Furthermore, although Sutanto et al. have conducted waist circumference measurements, details regarding the measurements obtained before, during, and after 5-HTP supplementation have not been fully elucidated. Considering that 5-HTP is also known to promote decreased food intake and weight loss, it is possible that these changes could affect waist circumference measurements [5]. Therefore, we suggest that future studies provide more comprehensive descriptions of the anthropometric measurements taken and establish a plan to monitor them over time. This additional attention to detail would contribute to a deeper understanding of the effects of this intervention on the composition of the microbiota and overall metabolic health. Finally, we emphasize the significant contribution of Sutanto et al. to the scientific community, particularly for offering new perspectives on improving sleep quality in older adults.

Author contributions

ITSAS, DEdSF and MSSF: conception, interpretation and writing of the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript for important intellectual content and approved the final version of it.

Financial support

None.

Conflict of interest

None.

Acknowledgment

We thank all authors and their respective institutions for their contribution to this manuscript.

References

- [1] Sutanto CN, Xia X, Heng CW, Tan YS, Lee DPS, Fam J, et al. The impact of 5-hydroxytryptophan supplementation on sleep quality and gut microbiota composition in older adults: a randomized controlled trial. *Clin Nutr* 2024;43:593–602.
- [2] Panagiotou M, Michel S, Meijer JH, Deboer T. The aging brain: sleep, the circadian clock and exercise. *Biochem Pharmacol* 2021;191:114563.

<https://doi.org/10.1016/j.cinu.2024.05.010>

0261-5614/© 2024 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

I.T.S. Alves da Silva, D.E. da Silva Fidelis, R.F. de Souza et al.

Clinical Nutrition 43 (2024) 1597–1598

- [3] Wang X, Wang Z, Cao J, Dong Y, Chen Y. Gut microbiota-derived metabolites mediate the neuroprotective effect of melatonin in cognitive impairment induced by sleep deprivation. *Microbiome* 2023;11:17.
- [4] Gardani M, Bradford DRR, Russell K, Allan S, Beattie L, Ellis JG, et al. A systematic review and meta-analysis of poor sleep, insomnia symptoms and stress in undergraduate students. *Sleep Med Rev* 2022;61:101565.
- [5] Maffei ME. 5-Hydroxytryptophan (5-HTP): natural occurrence, analysis, biosynthesis, biotechnology, physiology and toxicology. *Int J Mol Sci* 2020;22.

Ingrid Thayanne Souza Alves da Silva
Faculdade Pernambucana de Saúde, Recife, Brazil

Débora Eduarda da Silva Fidelis
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife 50740-600, Pernambuco, Brazil

Raphael Fabricio de Souza
Department of Physical Education, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil

Matheus Santos de Sousa Fernandes*
Keizo Asame Institute, Federal University of Pernambuco, Recife 50740-600, Pernambuco, Brazil

* Corresponding author.
E-mail address: theusfernandes92@gmail.com (M. Santos de Sousa Fernandes).

29 March 2024

4. Capítulo de livro: RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA MICROBIANA: UM OLHAR DA SAÚDE ÚNICA Volume 1 – 2024.

Capítulo 4

PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA DE *Acinetobacter baumannii*

MAIN MECHANISMS OF RESISTANCE AND VIRULENCE OF *Acinetobacter baumannii*

Adriano Fábio de Lima¹

Esaú Simões da Silva²

Débora Eduarda da Silva Fidelis³

Tiago Lacerda Ramos⁴

Hanne Lazla Rafael de Queiroz Macêdo⁵

Luís André de Almeida Campos⁶

Isabella Macário Ferro Cavalcanti⁷

DOI 10.46898/rfb.9786558898962.4

¹ <http://lattes.cnpq.br/1462493415427075>

² <https://orcid.org/0000-0002-9514-3244>

³ <http://lattes.cnpq.br/6586846325471746>

⁴ <http://lattes.cnpq.br/6272626842681695>

⁵ <https://orcid.org/0000-0002-9595-9913>

⁶ <https://orcid.org/0000-0002-9849-922X>

⁷ <https://orcid.org/0000-0002-7889-3502>