



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

INSTITUTO KEIZO ASAMI

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

TIAGO LACERDA RAMOS

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE INDICADORES DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES HEPÁTICA E  
MUSCULAR ESQUELÉTICA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS EM IDADE  
JUVENIL**

Recife

2025

TIAGO LACERDA RAMOS

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE INDICADORES DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTE HEPÁTICA E  
MUSCULAR ESQUELÉTICA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS EM IDADE  
JUVENIL**

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<sup>o</sup>. Dr. Fabrício Oliveira Souto

**Coorientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Matheus Santos de Sousa Fernandes

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Ramos, Tiago Lacerda. Efeitos do enriquecimento ambiental sobre indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidante hepática e muscular esquelética de camundongos fêmeas em idade juvenil / Tiago Lacerda Ramos. - Recife, 2025. 53 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia aplicada à Saúde, 2025. Orientação: Fabrício Oliveira Souto.

Coorientação: Matheus Santos de Sousa Fernandes.

Inclui referências.

1. Enriquecimento ambiental; 2. Estresse oxidativo; 3. Atividade física voluntária. I. Souto, Fabrício Oliveira. II. Fernandes, Matheus Santos de Sousa. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

TIAGO LACERDA RAMOS

**EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE INDICADORES DE  
ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES HEPÁTICA E  
MUSCULAR ESQUELÉTICA DE CAMUNDONGOS FÊMEAS EM IDADE  
JUVENIL**

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.

Aprovado em:

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Diorginis José Soares Ferreira

Universidade Federal do Vale de São Francisco - UNIVASF

---

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dra. Paula Sandrin Garcia

Universidade Federal de Pernambuco

---

## Dedicatória

“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, aos meus pais, familiares, amigos e professores que me auxiliaram e me apoiaram nesta importante etapa da minha vida, sou imensamente grato a todos vocês.”

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e pela graça concedidas ao longo desta jornada acadêmica, permitindo que eu superasse os desafios e alcançasse este objetivo.

Agradeço aos meus pais e familiares, por todo o amor, paciência e apoio incondicional. Vocês foram o alicerce que me sustentou em momentos de dificuldade e a inspiração para seguir em frente.

Agradeço ao meu orientador Fabrício Oliveira Souto, ao Coorientador Matheus Santos de Sousa Fernandes, pela dedicação, paciência e pelos ensinamentos compartilhados durante este processo. A orientação de vocês foi essencial para a concretização deste trabalho.

Agradeço aos colegas de pesquisa e amigos que estiveram ao meu lado durante essa trajetória. Cada conversa, conselho e incentivo fizeram toda a diferença para que eu pudesse concluir mais esta etapa.

À equipe técnica e administrativa da [UFPE/LIKA], por todo o suporte oferecido, contribuindo de forma significativa para o desenvolvimento deste estudo.

Por fim, agradeço aos participantes diretos e indiretos que tornaram este estudo possível, seja pela contribuição científica, pelo apoio emocional ou pela simples presença que enriqueceu minha caminhada.

## RESUMO

O enriquecimento ambiental (EA) é uma ferramenta não farmacológica que promove efeitos psicofisiológicos a nível sistêmico, desde aspectos cognitivos, metabólicos e sensorio-motores. O estresse oxidativo (EO) se caracteriza pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS/ERNS), associada a uma incapacidade do sistema antioxidante em lidar com isto, promovendo danos celulares e a órgãos essenciais, como o fígado e músculo esquelético. O EA é uma intervenção não farmacológica de baixo custo, com eficácia na redução de compostos pró-oxidativos e no aumento das defesas antioxidantes em roedores. **Objetivo:** Avaliar os impactos do EA sobre indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes no fígado e músculo esquelético de camundongos fêmeas em idade juvenil. **Métodos:** Foram utilizados camundongos fêmeas *C57BL/6* do biotério de criação do Instituto de Imunopatologia Keizo Asami (iLIKA). Aos 35 dias de vida os animais foram randomicamente alocados em dois grupos: **(G1)** Ambiente padrão (n = 11); **(G2)** Ambiente Enriquecido (n = 13). Posteriormente, foram expostos a 3 semanas de EA, com trocas semanais de objetos. Os animais tiveram acesso à água e comida à vontade, sendo pesados semanalmente junto à troca do padrão de enriquecimento. **Resultados:** Foi possível observar uma diminuição significativa no peso corporal dos animais após três semanas de intervenção ( $p = 0,04$ ,  $\Delta = -6.33\%$ ). Os níveis de MDA/Carbonilas no fígado diminuíram significativamente ( $p = 0,0080$ ,  $\Delta = -78.91\%$ ) e ( $p = 0,0498$ ,  $\Delta = -12.25\%$ ), assim como no músculo (exceto as carbonilas), ( $p = 0,0238$ ,  $\Delta = -42.12\%$ ). Observamos um aumento significativo na defesa antioxidante enzimática hepática SOD/CAT/GST, ( $p = 0,0153$ ,  $\Delta = 236.82\%$ ), ( $p = 0,0006$ ,  $\Delta = 53.00\%$ ) e ( $p = 0,0020$ ,  $\Delta = 163.63\%$ ), assim como no músculo (exceto a catalase), ( $p = 0,0027$ ,  $\Delta = 253.84\%$ ) e ( $p = 0,0017$ ,  $\Delta = 93.54\%$ ). Também observamos uma diminuição nos níveis de GSH/GSSG no fígado e músculo esquelético, porém ao avaliar o estado redox a proporção entre os níveis era significativamente maior no grupo EA ( $p = 0,0489$ ,  $\Delta = 348.36\%$ ) e ( $p = 0,0313$ ,  $\Delta = 138.42\%$ ). Por fim, observamos um aumento significativo nos níveis de sulfidrilas hepáticas ( $p = 0,0167$ ,  $\Delta = 42.85\%$ ). **Conclusão:** Três semanas de EA é capaz de promover efeitos positivos no peso corporal e balanço oxidativo de camundongos fêmeas em idade juvenil.

**Palavras chaves:** Enriquecimento Ambiental. Estresse Oxidativo. Atividade Física Voluntária. Fígado. Músculo Esquelético.

## ABSTRACT

Environmental enrichment (EE) is a non-pharmacological tool that promotes psychophysiological effects at a systemic level, including cognitive, metabolic and sensorimotor aspects. Oxidative stress (OS) is characterized by the excessive production of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/ERNS), associated with an inability of the antioxidant system to cope with this, promoting cellular damage and damage to essential organs, such as the liver and skeletal muscle. EE is a low-cost non-pharmacological intervention that is effective in reducing pro-oxidative compounds and increasing antioxidant defenses in rodents. Objective: To evaluate the impacts of EE on indicators of oxidative stress and antioxidant defenses in the liver and skeletal muscle of juvenile female mice. Methods: Female C57BL/6 mice from the breeding facility of the Keizo Asami Institute of Immunopathology (iLIKA) were used. At 35 days of age, the animals were randomly allocated into two groups: (G1) Standard Environment (n = 11); (G2) Enriched Environment (n = 13). Subsequently, they were exposed to 3 weeks of EE, with weekly changes of objects. The animals had access to water and food ad libitum, and were weighed weekly together with the change of the enrichment pattern. Results: It was possible to observe a significant decrease in the body weight of the animals after three weeks of intervention ( $p = 0.04$ ,  $\Delta = -6.33\%$ ). The levels of MDA/Carbonyls in the liver decreased significantly ( $p = 0.0080$ ,  $\Delta = -78.91\%$ ) and ( $p = 0.0498$ ,  $\Delta = -12.25\%$ ), as well as in the muscle (except carbonyls), ( $p = 0.0238$ ,  $\Delta = -42.12\%$ ). We observed a significant increase in the hepatic enzymatic antioxidant defense SOD/CAT/GST, ( $p = 0.0153$ ,  $\Delta = 236.82\%$ ), ( $p = 0.0006$ ,  $\Delta = 53.00\%$ ) and ( $p = 0.0020$ ,  $\Delta = 163.63\%$ ), as well as in the muscle (except catalase), ( $p = 0.0027$ ,  $\Delta = 253.84\%$ ) and ( $p = 0.0017$ ,  $\Delta = 93.54\%$ ). We also observed a decrease in GSH/GSSG levels in the liver and skeletal muscle, but when evaluating the redox state, the ratio between the levels was significantly higher in the EA group ( $p = 0.0489$ ,  $\Delta = 348.36\%$ ) and ( $p = 0.0313$ ,  $\Delta = 138.42\%$ ). Finally, we observed a significant increase in hepatic sulfhydryl levels ( $p = 0.0167$ ,  $\Delta = 42.85\%$ ). Conclusion: Three weeks of EA is able to promote positive effects on body weight and oxidative balance of female mice at juvenile age.

**Key words:** Environmental Enrichment. Oxidative Stress. Voluntary Physical Activity. Liver. Skeletal Muscle.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Exemplos dos protocolos de ambiente padrão e enriquecimento ambiental utilizados.....	28
<b>Figura 2</b> - Efeitos do EA sobre o peso corporal ao longo de 4 semanas.....	32
<b>Figura 3</b> - Marcadores de estresse oxidativo no fígado (Malonaldeídos/Carbonilas).....	33
<b>Figura 4</b> - Efeito do EA sobre atividade antioxidante enzimática no fígado (SOD/CAT/GST).....	34
<b>Figura 5</b> - Efeitos do EA sobre atividade antioxidante não enzimática e Sulfidrilas.....	35
<b>Figura 6</b> - Efeitos do EA sobre indicadores de Estresse oxidativo no músculo esquelético.....	36
<b>Figura 7</b> - Efeitos do EA sobre defesa antioxidante enzimática no músculo EDL.....	37
<b>Figura 8</b> - Efeitos do EA sobre atividade antioxidante não enzimática e Tióis totais no músculo EDL.....	38

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> – Tamanho do efeito produzido por três semanas de EA no peso corporal e balanço oxidativo hepático.....	40
<b>Tabela 2</b> – Tamanho do efeito produzido por três semanas de EA no balanço oxidativo muscular esquelético.....	41

## LISTA DE SIGLAS

EA – Enriquecimento Ambiental

EO – Estresse Oxidativo

EROS – Espécies Reativas de Oxigênio

ERNS – Espécies Reativas de Nitrogênio

ME – Músculo Esquelético

ATP – Adenosina Trifosfato

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ADP – Adenosina Difosfato

RL – Radicais Livres

NAD – Nicotinamida Adenina Dinucleótídeo

SOD – Superóxido Dismutase

CAT – Catalase

GST – Glutathione S Transferase

GSH – Glutathione Reduzida

GSSG – Glutathione Oxidada

LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

EDL – Extensor Longo dos Dedos

pH – Potencial Hidrogeniônico

MDA – Malonaldeído

TCA – Ácido Tricloroacético

DNPH - Dinitrofenilhidrazina

CNBD - Cloro-2,4-Dinitrobenzeno

OPT - O-Phthaldialdehyde

NEM - N-ethylmaleimida

CEUA – Comitê Ético no Uso de Animais

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

NIH – National Institute of Health

SE – Sem Enriquecimento

H – Átomo de Hidrogênio

S – Átomo de Enxofre

RPM – Rotações por Minuto

## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	<b>15</b>
<b>2. Fundamentação teórica</b> .....	<b>16</b>
2.1 Fígado.....	16
2.1.1 Composição morfológica hepática .....	16
2.1.2 Aspectos funcionais hepáticos .....	17
2.1.3 Fígado e Metabolismo energético .....	18
2.3 Músculo esquelético.....	19
2.3.1 Contração muscular.....	19
2.3.2 Metabolismo no músculo esquelético .....	20
2.4 Metabolismo.....	20
2.4.1 Reações anabólicas e catabólicas .....	21
2.4.2 Produção de ATP .....	22
2.5 Estresse oxidativo.....	23
2.6 Componentes da defesa antioxidante enzimática e não enzimática .....	24
2.7 Enriquecimento ambiental.....	25
<b>3. Hipótese</b> .....	<b>27</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>27</b>
4.1 Objetivo geral.....	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
<b>5. Materiais e métodos</b> .....	<b>27</b>
5.1 Animais e grupos experimentais .....	27
5.2 Enriquecimento ambiental.....	28
5.3 Eutanásia, tecidos biológicos e materiais biológicos .....	28
5.4 Dosagem de proteína.....	29
<b>6. Biomarcadores de estresse oxidativo</b> .....	<b>29</b>
6.1 Medida da substância reativa do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	29
6.2 Oxidação proteica.....	29
6.3 Atividade enzimática antioxidante .....	30
6.3.1 Superóxido dismutase (SOD).....	30
6.3.2 Catalase (CAT).....	30
6.3.3 Glutathione S Transferase (GST).....	30
6.4 Atividade não enzimática antioxidante .....	30
6.4.1 Glutathione reduzida (GSH), Oxidada (GSSG), e Estado Redox (GSH/GSSG) .....	30
6.4.2 Sulfidrilas .....	31
6.5 Aspectos éticos.....	31
6.6 Análise estatística.....	31

<b>7. Resultados</b> .....	<b>31</b>
7.1 Efeitos do Enriquecimento Ambiental no peso corporal.....	31
7.2 Efeitos do EA sobre marcadores de estresse oxidativo no fígado.....	32
7.3 Efeitos do EA sobre defesa antioxidante enzimática hepática .....	33
7.4 Efeitos do EA sobre defesa antioxidante não enzimática hepática .....	34
7.5 Efeitos do EA sobre os níveis de sulfidrilas no fígado.....	35
7.6 Efeitos do EA sobre indicadores de estresse oxidativo no músculo esquelético.....	35
7.7 Efeitos do EA sobre defesa antioxidante enzimática no músculo esquelético .....	36
7.8 Efeitos do EA sobre defesa antioxidante não enzimática no músculo esquelético .....	37
7.9 Efeitos do EA sobre os níveis de sulfidrilas no músculo esquelético .....	38
<b>8. Cálculo do tamanho do efeito produzido pelo EA</b> .....	<b>39</b>
<b>9. Discussão</b> .....	<b>42</b>
<b>10. Limitações e perspectivas futuras</b> .....	<b>44</b>
<b>11. Considerações finais</b> .....	<b>44</b>
<b>12. Referências</b> .....	<b>45</b>
<b>13. Atividade em paralelo</b> .....	<b>51</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O enriquecimento ambiental (EA) consiste em uma ferramenta não farmacológica que visa proporcionar efeitos psicofisiológicos à nível sistêmico (Fernandez, Collazo et al. 2004), (Cechetti, Worm et al. 2012). Evidências demonstram que esse modelo surgiu em 1947, através de Donald Hebb, que ao estudar o comportamento animal percebeu que a variabilidade ambiental poderia estar relacionada a alterações neurofisiológicas e comportamentais (Muhammad, Magaji et al. 2017). Atualmente, sabe-se que o EA é capaz de promover melhorias em funções cognitivas, incluindo memória e aprendizagem, bem como nos aspectos sensorio-motores por meio de objetos inanimados com variabilidade de formas e texturas inseridos no ambiente. Além disso, preconiza-se uma maior interação social através do número elevado de animais no EA, e promoção de atividade física voluntária por aumento do comportamento exploratório destes animais (Harland and Dalrymple-Alford 2020), (Suzuki, Minamide et al. 2020).

O metabolismo consiste em um conjunto de reações químicas, de caráter anabólico e catabólico, mediadas por complexos enzimáticos, que visam a manutenção da homeostase corporal e da vida (Ghoneum, Abdulfattah et al. 2020). No entanto, alterações na estabilidade metabólica podem promover diversas alterações orgânicas, incluindo o estresse oxidativo (EO), que se encontra atrelado a fisiopatologia de doenças crônicas degenerativas, tais como diabetes mellitus tipo 2, doenças cardiovasculares e Alzheimer (Beyfuss and Hood 2018). O EO é caracterizado pelo desbalanço entre a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS/ERNS) associada a redução da capacidade antioxidante, podendo proporcionar danos na membrana plasmática, organelas citoplasmáticas, tais como as mitocôndrias e morte celular programada, afetando órgãos fundamentais para o controle energético, como fígado e músculo esquelético (Sies 2015). No entanto, sabe-se que a produção de espécies reativas dentro dos limites fisiológicos é importante para manter a homeostase celular (Blanton, He et al. 2015).

Para contenção do EO e suas consequências, várias estratégias têm sido estudadas, dentre elas encontra-se o EA. Evidências demonstram que o enriquecimento do ambiente pode atenuar a produção de compostos pró-oxidativos, incluindo malonaldeído e carbonilas, além de potencializar maior atividade das defesas antioxidantes enzimáticas e

não enzimáticas, demonstrando ser uma ferramenta promissora (Mohajan 2025). Contudo, mesmo com esses efeitos citados anteriormente, ainda não são claros quais os reais efeitos do EA em componentes metabólicos e no balanço oxidativo de modelos experimentais. Isto ocorre devido a variabilidade na estruturação dos protocolos de EA, no que se diz respeito ao tamanho do ambiente, quantidade de animais inseridos, tempo de intervenção, número e tipo dos objetos inseridos, entre outros fatores. Com isso, o objetivo deste estudo é avaliar os impactos do EA sobre indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas no fígado e músculo esquelético de camundongos fêmeas em idade juvenil.

## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 FÍGADO**

O fígado é um órgão essencial para o metabolismo humano, ele possui um papel importante no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas (Silverthorn 2017). Sendo o maior órgão interno do corpo humano, o mesmo possui um papel crucial na homeostase do organismo. Encontrado na região superior direita do abdômen, ele é protegido pela caixa torácica e se divide em dois lobos principais: esquerdo e direito. A vascularização rica é garantida pelo sistema sanguíneo portal hepático, responsável por transportar sangue rico em nutrientes vindos do trato gastrointestinal, e pela artéria hepática, que fornece oxigênio (Gelfand 1980).

O fígado possui uma incrível capacidade de regeneração. Ele consegue retomar tanto seu tamanho quanto seu volume normal ligeiramente após alguma perda substancial do tecido hepático. Isto ocorre, principalmente, por conta do aumento na proliferação de hepatócitos. Tal processo ocorre de maneira organizada, até que o fígado consiga recuperar seu tamanho natural (Racanelli and Rehmann 2006). Este órgão assegura a produção de proteínas plasmáticas, como a albumina, sendo essa a proteína mais abundante no nosso sangue. Baixos níveis de albumina estão associados geralmente a hepatopatias (Bismuth 1986).

#### **2.1.1 COMPOSIÇÃO MORFOLÓGICA HEPÁTICA**

Do ponto de vista morfofuncional, o fígado é composto por lóbulos, ou seja, unidades estruturais formadas por hepatócitos, que se localizam ao redor de uma veia central (Junqueira and Carneiro 2022). Tais lóbulos hepáticos estão envolvidos por sinusoides hepáticos responsáveis por facilitar a troca de substâncias entre sangue e os

hepatócitos. Existe um tipo de macrófago residente presente nos sinusoides, responsáveis por desempenhar funções imunológicas importantes, como a fagocitose de patógenos e células danificadas, tal macrófago é conhecido como células de Kupffer (Martins and Neuhaus 2007).

As organelas especializadas como o retículo endoplasmático liso e rugoso, mitocôndrias e complexo de Golgi estão localizadas nos hepatócitos e elas sustentam diversas funções metabólicas e secretoras. Tal organização estrutural garante a eficiência das funções hepáticas que impacta efetivamente em todo organismo (Kruepunga, Hakvoort et al. 2019).

### **2.1.2 ASPECTOS FUNCIONAIS HEPÁTICOS**

O fígado é um órgão multifuncional, que atua principalmente na regulação do metabolismo, digestão e desintoxicação (Han, Kang et al. 2016). Dentre suas principais funções, encontra-se sua participação no metabolismo de nutrientes. Evidências demonstram que o fígado pode controlar os níveis de glicose sanguínea através dos processos bioquímicos de gliconeogênese, glicogênese e glicogenólise (Moreira 2023). Além disso, também é responsável por metabolizar lipídeos, sintetizando colesterol, triglicerídeos e lipoproteínas. Em segundo lugar, o fígado participa da produção de bile. Os hepatócitos são responsáveis por produzir a bile, que é um líquido essencial na digestão e absorção de gorduras no intestino, além de ajudar na excreção de substâncias como bilirrubina e colesterol. Em terceiro lugar, desintoxicação e biotransformação: O fígado elimina e metaboliza toxinas, medicamentos e produtos metabólicos como amônia, transformando estes em compostos menos tóxicos e solúveis, que podem ser excretados pelo sistema biliar ou pelos rins (Adeva-Andany, Pérez-Felpete et al. 2016).

Armazenamento de nutrientes e vitaminas: O fígado armazena glicogênio, vitaminas (A, D, K, E e B12) e minerais (ferro e cobre) disponibilizando-os quando necessário, garantindo um equilíbrio metabólico e atendendo as demandas fisiológicas do organismo. Glicogênio, vitaminas (A, D, E e K) e minerais como o ferro (na forma de ferritina) são armazenados para suprir o organismo em períodos de baixa ingestão alimentar, o ferro também é mobilizado para a produção de hemoglobina, enquanto a vitamina D é convertida em sua forma ativa para regular o metabolismo do cálcio e fósforo (Carneiro 2020). Produção de fatores de coagulação: Ele sintetiza proteínas essenciais para a coagulação do sangue, como protrombina e fibrinogênio, exercendo um

papel importante no controle de hemorragias. Função Imunológica: Além das células de Kupffer, o fígado atua como um filtro imunológico, removendo patógenos circulantes na circulação sanguínea provenientes do trato gastrointestinal (Cahill JR, Ashmore et al. 1958).

Dito isto, o fígado é um órgão vital que integra diversos processos metabólicos, imunológicos e digestivos (Jones 2016). Sua capacidade de regeneração é notável, no entanto, a exposição prolongada a agentes nocivos, como medicamentos hepatotóxicos, infecções e álcool podem comprometer suas funções, resultando em doenças hepáticas (Barrea, Di Somma et al. 2018). A compreensão do ponto de vista morfofuncional hepático é essencial para o estudo de patologias, assim como para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes (Lemieux and Després 2020).

### **2.1.3 FÍGADO E METABOLISMO ENERGÉTICO**

O fígado é um órgão importante, com diversas funções que são essenciais para o controle do metabolismo no organismo. Este órgão atua como um centro metabólico, unindo processos que fazem parte do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Fora isso, também desempenha papéis indispensáveis na desintoxicação, armazenamento de vitaminas e produção de bile (Guyton Arthur and Hall John 2006).

No metabolismo de lipídios, o fígado sintetiza, oxida e guarda ácidos graxos, ele também produz lipoproteínas e colesterol, que são fundamentais para a estrutura celular e a produção de hormônios. No metabolismo dos carboidratos, ele controla os níveis de glicose sanguínea através de processos como glicogenólise, glicogênese e gliconeogênese, assegurando que a disponibilidade de energia esteja de acordo com as demandas do organismo. Por fim, no metabolismo de proteína, o fígado produz proteínas plasmáticas, como a albumina, contribuindo assim com a eliminação de amônia por meio do ciclo da ureia (Carneiro 2020).

Sendo assim, o fígado é um órgão sensível a mudanças/alterações metabólicas que são associadas a condições patológicas, como a resistência à insulina, obesidade e doenças metabólicas. Tais condições podem levar a danos hepáticos, como é o caso da esteatose hepática (acúmulo de gordura no fígado), inflamação e, em casos severos, fibrose e cirrose. A conexão entre este órgão e o metabolismo o torna um alvo em destaque para estudos sobre imunometabolismo e doenças sistêmicas, desde doenças metabólicas crônicas ao câncer (Farazi and DePinho 2006).

## **2.3 MÚSCULO ESQUELÉTICO**

O músculo esquelético (ME) é um tecido de origem mesodérmica caracterizado pela presença de células alongadas denominadas de miócitos, que possuem um citoplasma rico em fibras proteicas, que concedem às fibras que compõem o tecido a capacidade de contração. Além disso, o ME possui uma enorme capacidade adaptativa, ele consegue suportar diversas exigências metabólicas e fisiológicas causadas por agentes estressores. Esta adaptabilidade do músculo esquelético é um aspecto fundamental para que ele seja capaz de atuar na regulação da homeostase celular e corporal (Hawley and Leckey 2015). Os músculos esqueléticos correspondem a cerca de 40% de nossa massa corporal total e é um dos três tipos principais de músculos do corpo humano, juntamente com o cardíaco e liso, sendo assim, mantê-los saudáveis e funcionais é essencial para saúde de todo o corpo (Rezzani and Franco 2021).

Este tecido é controlado pelo sistema nervoso somático, o que torna um tecido voluntário. Os neurônios motores inervam as fibras musculares, esse processo auxilia na formação da junção neuromuscular que recebem impulsos nervosos, fazendo com que a contração muscular ocorra, mediante a liberação de neurotransmissores, como a acetilcolina. Os neurotransmissores são substâncias químicas que atuam como mensageiros no sistema nervoso, enviando e recebendo sinais entre neurônios e células-alvo, como os músculos esqueléticos. Tais substâncias são essenciais para comunicação e transmissão de informações ao longo do sistema nervoso e, sem eles, por exemplo, não seria possível realizar as contrações (Frontera and Ochala 2015).

### **2.3.1 CONTRAÇÃO MUSCULAR**

O ME é um órgão capaz de transformar energia química em energia mecânica, ou seja, capaz de realizar movimentos através de contrações musculares. A contração é conceitualmente conhecida como a ativação das fibras musculares com a intenção destas se encurtarem (Børsheim and Bahr 2003). Os diversos músculos esqueléticos do corpo humano são formados por centenas de milhares de fibras musculares e, cada fibra possui as proteínas contráteis, principalmente actina e miosina, formando os filamentos finos e grossos, sendo encontrados paralelamente nas miofibrilas que compõem as fibras musculares. As miofibrilas que estão paralelamente dispostas apresentam um padrão de bandas claras e escuras arranjadas em série e, essa organização altamente estruturada é responsável por tal aparência estriada destes músculos (Delbono, Rodrigues et al. 2021).

Além disso, grande parte da energia biodisponível na forma de adenosina trifosfato (ATP) produzida ao longo de um dia normal é consumida por eles. Os músculos usam o ATP tanto para manutenção dos gradientes iônicos como para contração muscular. Além disso, o ME é rico em creatina fosfato, uma reserva energética utilizada em momentos de rápida produção de ATP, ou seja, em situações em que nos deparamos com cargas de trabalho intensas, mas de curta duração, uma vez que nossos estoques de creatina no músculo são relativamente baixos (Brooks 2003). Os músculos consistem basicamente de duas proteínas filamentosas, sendo elas: actina e miosina. Tais proteínas utilizam ATP na presença de cálcio, levando à contração muscular. A quantidade de cálcio no citoplasma muscular (sarcoplasma) é relativamente baixa, mas aumenta significativamente em cerca de 100 vezes, em resposta a estímulos nervosos, levando à contração (Exeter and Connell 2010).

### **2.3.2 METABOLISMO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO**

Os compostos primordiais para o músculo são a glicose, ácidos graxos e corpos cetônicos. Em seu estado de repouso, os ácidos graxos são os principais substratos utilizados, proporcionando 85% das necessidades energéticas. O ME difere do cérebro e de outros órgãos por possuir um grande depósito de glicogênio armazenado, cerca de 75% do glicogênio é armazenado no músculo. Este glicogênio é rapidamente transformado em glicose e utilizado como fonte de energia em momentos de atividade muscular moderada. Os músculos possuem relação entre a disposição e função das proteínas e exibem a conservação da energia química ATP como energia conformacional da proteína muscular. Tanto a glicólise quanto o metabolismo dos lipídios são fundamentais para o funcionamento dos músculos, a prevalência por vias aeróbias/anaeróbias varia de acordo com as características do músculo e à atividade que está sendo realizada (Richter and Hargreaves 2013).

Os músculos brancos necessitam primeiramente do glicogênio e da glicólise anaeróbica para breves consumos energéticos. Já os músculos vermelhos, ao iniciar alguma atividade física também necessitam da glicogenólise e da glicólise, mas ao decorrer da mesma convertem o metabolismo de gorduras para uma produção mais prolongada de energia e, além disso, em repouso essas musculaturas também utilizam as gorduras como fonte primária de energia (Mengeste, Rustan et al. 2021).

### **2.4 METABOLISMO**

O metabolismo é conhecido comumente por ser uma série de reações químicas mediadas por diversas enzimas ligadas a transformação de compostos químicos, de uma maneira cuidadosamente estabelecida. Todos os seres vivos precisam de acesso contínuo à energia para três propósitos, sendo eles: (1) a realização de trabalho mecânico através da contração muscular e outros movimentos celulares, (2) o transporte eficiente de moléculas e íons e (3) a formação de macromoléculas e outras moléculas biológicas a partir de simples precursores. A energia independente usada nestes procedimentos é derivada do ambiente, esta energia química é obtida através da oxidação de alimentos, por exemplo. Sendo assim, pode-se afirmar que o metabolismo, dentre suas várias funções, ocorre com a finalidade de manter a homeostase corporal e a vida (Westerblad, Bruton et al. 2010).

#### **2.4.1 REAÇÕES ANABÓLICAS E CATABÓLICAS**

O metabolismo constitui-se de reações químicas que produzem energia e de reações químicas que precisam de energia. Existem diversas vias definidas nas células e, tais vias são interdependentes, assim como sua atividade é controlada de maneira extremamente sensível de comunicação. É possível dividir as vias metabólicas em duas classes amplas: (1) as que modificam energia para formas biologicamente utilizáveis e (2) as que precisam de energia para acontecerem. Por mais que tais divisões não sejam extremamente precisas, ela é, contudo, uma importante diferenciação quando se examina o metabolismo. As reações que convertem os compostos energéticos (alimentos/substratos) em energia são denominadas reações de quebra/degradação, ou seja, catabólicas, estas reações são chamadas habitualmente de catabolismo. Por outro lado, as reações que precisam de energia, como por exemplo a síntese de lipídios, DNA ou glicose, são denominadas de reações anabólicas ou de anabolismo (Morgan and Partridge 2020).

Os meios aproveitáveis de energia que se formam no catabolismo são empregados ao anabolismo, para que seja possível a formação de estruturas mais complexas, através das simples. Existem vias que podem ser tanto anabólicas quanto catabólicas, tudo dependerá das condições energéticas da célula. Essas vias são conhecidas como vias anfibólicas. Uma regra geral do metabolismo, diz que as vias de biossíntese e as de degradação na maioria das vezes diferem. Tal divisão é necessária e ocorre por razões energéticas, facilitando o controle do metabolismo. Sabe-se que as vias metabólicas são formadas através de reações individuais. Uma via metabólica precisa satisfazer ao menos

dois critérios: (1) as reações individuais precisam ser específicas, ou seja, ela resultará apenas em um produto ou conjunto produtos em específico derivados de seus reagentes e o papel das enzimas é estabelecer esta especificidade (2) o conjunto total de reações que formam a via precisa ser termodinamicamente favorável (Beyfuss and Hood 2018).

#### **2.4.2 PRODUÇÃO DE ATP**

No metabolismo, o ATP é a “moeda” universal de energia livre em sistemas biológicos. Digamos que assim como o comércio é facilitado através do uso de uma moeda de troca (dinheiro), o comércio da célula, ou seja, o metabolismo, é facilitado com a utilização desta moeda de energia, o ATP. Porções da energia solta proveniente da oxidação dos alimentos e da luz é convertida em ATP, uma vez convertido, o ATP atua como doador na maioria dos processos que precisam de energia, tais como transporte ativo, biossíntese e movimento. A maioria das reações catabólicas é constituída de reações que retiram energia de moléculas energéticas, como lípideos e glicídios, e os transforma em ATP (Gomes, Martinez et al. 2017). O ATP é um nucleotídeo formado por uma adenina, uma ribose e uma unidade trifosfato. Considerando que o ATP é uma moeda carregadora de energia, pode-se destacar sua parte trifosfato, uma vez que ela possui duas ligações de anidrido fosfórico. Sendo assim, ao sofrer hidrólise para adenosina difosfato (ADP), o ATP é capaz de liberar grande quantidade de energia (Distefano and Goodpaster 2018).

Partindo de uma visão global, é possível afirmar que a energia proveniente dos alimentos é extraída em três etapas. Hans Krebs expôs essas etapas da produção de energia a partir da oxidação de alimentos. A princípio as grandes moléculas de alimentos são degradadas em partes menores. Este processo é conhecido como digestão. Os lípideos são hidrolisados a glicerol e ácidos graxos, os poliosídeos à oses, como as glicoses e as proteínas são hidrolisadas a aproximadamente 20 tipos de aminoácidos. Nenhuma energia é coletada nesta fase, é apenas uma preparação. Na próxima etapa, as pequenas moléculas são quebradas em unidades menores, desempenhando um papel essencial no metabolismo. A maioria dessas moléculas (glicerol, oses, ácidos graxos e aminoácidos) são convertidas em acetil-CoA. Algumas moléculas de ATP são produzidas nesta etapa. Por fim, na última etapa, o ATP é formado através da oxidação da molécula de acetil-CoA. Esta etapa é formada pelo ciclo ácido cítrico/ciclo de Krebs e pela fosforilação oxidativa, sendo essas as vias finais de oxidação das moléculas alimentares (Paquot 2019).

## 2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

A princípio, o metabolismo aparenta ser assustador, por conta de incontáveis reagentes e reações. No entanto, existem maneiras uniformes que tornam o entendimento mais claro. Uma vez que se tem uma base sobre o que se trata o metabolismo, é importante enfatizar possíveis complicações que podem surgir a partir do mal funcionamento dele. Dentre elas, está o estresse oxidativo (EO). Este fenômeno ocorre devido ao desbalanço entre a produção excessiva de compostos oxidantes e à atuação dos sistemas de defesa antioxidante mediados por enzimas, ou não (Nelson and Cox 2022). A produção de radicais livres (RL), por sua vez, é um processo fisiológico, que possui funções biológicas importantes. Ao longo dos processos metabólicos, estes radicais trabalham como mediadores na transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas. Sua formação em quantidades adequadas torna possível a produção de ATP através da cadeia transportadora de elétrons, permite também a fertilização do óvulo, a ativação de genes e a participação em mecanismos de defesa durante processos infecciosos (Jones 2008). Contudo, existem situações em que ocorre o desemparelhamento de elétrons nestes compostos, que passam a assumir a forma de espécies reativas, principalmente de oxigênio. O excesso na produção de EROS/ERNS pode levar a danos oxidativos (Creczynski-Pasa and Antônio 2004).

As defesas antioxidantes possuem a função de limitar os níveis intracelulares das espécies reativas e controlar os danos causados. Como dito antes, o EO acontece devido ao desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, a favor da produção em excesso de espécies reativas, ou da diminuição da velocidade de remoção delas. Este processo resulta na oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desbalanço homeostático, cujo resultado é o dano oxidativo potencial em células e tecidos. Quando este processo se torna crônico, ele tem implicações significativas sobre o processo etiológico e diversas enfermidades crônicas, dentre elas a diabetes, obesidade, aterosclerose, transtornos neurodegenerativos e câncer (McGlynn 2017).

Sendo assim, é importante entender os principais meios que geram o excesso de espécies reativas, assim como a ação dos agentes mais significativos do sistema de defesa antioxidante, destacando seus acometimentos sobre os marcadores de estresse oxidativo. Este sistema é normalmente dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase,

glutationa e peroxidase) e não enzimático (são constituídos por diversas substâncias antioxidantes, tendo origem dietética ou endógena (Bonora, Patergnani et al. 2012).

## **2.6 COMPONENTES DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA E NÃO ENZIMÁTICA**

A Superóxido Dismutase (SOD), é uma enzima antioxidante com um papel fundamental na proteção das células contra o estresse oxidativo, sendo responsável por catalisar a conversão do radical superóxido ( $O_2^-$ ), um subproduto reativo e potencialmente tóxico do metabolismo celular, em oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que é menos prejudicial. A Catalase (CAT), é uma enzima antioxidante importante no metabolismo das células, a CAT possui a função de decompor o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o transformando em água ( $H_2O$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ). Tal reação impede que o peróxido de hidrogênio se acumule nas células e forme espécies reativas de oxigênio (EROs) mais perigosas. Glutationa S Transferase (GST), é uma família de enzimas multifuncionais responsáveis pela detoxificação celular e na proteção contra o estresse oxidativo. As GSTs catalisam a conjugação da Glutationa (GSH), um tripeptídeo antioxidante, com compostos eletrofílicos tóxicos, como os xenobióticos e subprodutos reativos do metabolismo, realizando assim a excreção de maneira mais fácil e diminuindo seus efeitos prejudiciais (Barbosa, Costa et al. 2010).

A Glutationa Oxidada (GSSG) é uma forma oxidada da Glutationa Reduzida (GSH). No combate ao estresse oxidativo, a GSH doa elétrons para neutralizar EROs e outros radicais livres, tornando as células protegidas de possíveis danos. Ao longo desse processo, duas moléculas de GSH se oxidam e se ligam através de uma ponte dissulfeto, formando GSSG. O equilíbrio entre os níveis de GSSG e GSH é um indicador importante do estado redox da célula, por exemplo: Uma alta proporção de GSSG/GSH pode indicar que a célula está num ambiente redutor saudável, com boa capacidade antioxidante. Enquanto uma baixa proporção entre os níveis de GSSG/GSH pode sinalizar estresse oxidativo, que por sua vez, é associado a condições de inflamação e doenças metabólicas (Lehninger 2004).

As Sulfidrilas são um grupo funcional e se caracterizam por um átomo de enxofre (S) ligado a um átomo de hidrogênio (H). As sulfidrilas desempenham um papel importante na regulação e formação de processos celulares, por exemplo: São substâncias reativas capazes de participar de diversas reações biológicas importantes, como a

oxidação (formando pontes dissulfeto (-S-S-), sendo essenciais para a estabilidade de proteínas. Além disso, moléculas que possuem Sulfidrilas, como a GSH, têm propriedades antioxidantes importantes, como as citadas anteriormente), (Cox, Lehninger et al. 2006).

## **2.7 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL**

Seguindo deste ponto de vista, EA é descrito como uma ferramenta não farmacológica experimental onde os animais são acomodados em um ambiente que é capaz de aprimorar as interações sociais, estimulação motora, cognitiva e sensorial. Este modelo se baseia em três pontos de vista: o aspecto social, a estrutura do ambiente e as atividades que o animal poderá realizar nele (Graham and White 2016).

A exposição de animais a uma diversidade de estímulos como túneis, brinquedos, rodas de corrida e outros permitem que o animal desempenhe o seu comportamento natural. A interação social é essencial para roedores e consegue ser feita ao se permitir contato visual, auditivo, físico ou olfativo com outros animais. Em relação à prática de atividade física voluntária, é uma grande oportunidade de estimular a capacidade física e cognitiva do animal, além de também os estimular socialmente. Tal prática tem como objetivo promover a melhora em aspectos psicofisiológicos naqueles animais (Love, Gubert et al. 2022).

Tais modificações ambientais vêm sendo iniciadas em ambientes de pesquisas e laboratoriais e os resultados se mostram capazes de estimular o comportamento natural dos animais, fazendo com que eles voluntariamente interajam com os objetos dentro do ambiente, matando assim sua curiosidade por eles e suas respectivas necessidades. Em ambiente padrão esses animais são privados de tudo isso e apresentam sinais de estresse, comportamento anormal, sofrimento e doença. Ao inserir objetos no ambiente para que os animais possam interagir, é possível observar maior controle diante do ambiente em que estão inseridos e isso reflete em uma diminuição nos níveis de estresse, ou seja, o EA é capaz de aumentar a resiliência ao estresse desses animais (Crofton, Zhang et al. 2015).

Ainda não existe um padrão específico ou critérios bem estabelecidos para esta intervenção e, por conta disso, existe uma grande variedade de protocolos sendo utilizados na literatura, que por consequência, geram resultados distintos e de difícil interpretação. Mudanças nos objetos inseridos no ambiente, assim como no tamanho do

ambiente e no número de animais podem resultar em resultados diferentes sobre esses animais (Simpson and Kelly 2011).

Na maioria das vezes, dois pontos são levados em consideração nas intervenções com enriquecimento ambiental: à idade dos animais utilizados e à duração do protocolo de enriquecimento. Acredita-se que a plasticidade do cérebro está associada à idade e à duração do estímulo. Sendo assim, esses dois pontos estarão ligados às mudanças comportamentais causadas pelo enriquecimento ambiental. No entanto, para que o protocolo de enriquecimento continue gerando estímulos, parece existir a necessidade de que o estímulo seja realizado durante períodos de tempo específicos, ou seja, após alguns dias ou após uma semana, deve-se remanejar o ambiente, trocando os objetos de lugares, trocando os tipos de objetos, as cores e entre outras mudanças, para que o animal continue se sentindo de fato em um ambiente enriquecido, despertando sempre o instinto exploratório do animal diante de novos objetos e atividades (Ismail, Yap et al. 2021).

Existe mais de uma forma de enriquecimento ambiental, tudo depende do tipo de estímulo que se pretende promover nos animais, dos resultados esperados e de que forma isso será benéfico para o animal (Lambert, Fernandez et al. 2005). Na maioria das vezes o comportamento anormal desses animais está relacionado com os níveis de estresse que são impostos para eles naquele determinado ambiente. Uma das formas mais conhecidas de EA é aquela com um local rico em diferentes tipos de objetos, com um bom número de animais para promover o estímulo social e um tamanho superior ao de ambientes padrões, permitindo assim que o animal tenha a chance de interagir com outros da sua espécie e com os objetos ali inseridos, que despertam o seu instinto exploratório natural (Bayne 2018). Este tipo de enriquecimento é frequentemente usado em laboratórios. Outra forma de enriquecimento é o alimentar, a maneira como as comidas são dadas aos animais é um exemplo. A oferta de diferentes tipos de alimentos, assim como as diferentes formas de oferecê-los é uma forma de EA para o animal (Hobbiesiefken, Mieske et al. 2021). Essas mudanças estimulam a procura da comida pelos animais, podendo melhorar o seu estado nutricional. No entanto, pela falta de padronização na dieta dos animais, este tipo de experimento é inconveniente nos laboratórios, o que por consequência pode prejudicar os resultados da pesquisa (Speck, Gomes et al. 2023).

Pesquisas laboratoriais com animais afirmam que o EA é capaz de reduzir os danos oxidativos em roedores, tanto em tecidos cardíacos quanto em musculares. No entanto, esta diminuição nem sempre é seguida de um aumento na atividade das defesas

antioxidantes. Em sua maioria, os estudos apresentam uma diminuição nos níveis de compostos oxidantes, como as carbonilas, e um aumento na atividade antioxidante, tornando o ambiente metabólico estável e indo em direção oposta ao estresse oxidativo. Porém, como os protocolos de intervenção ainda não são totalmente claros e possuem várias divergências no que se diz respeito ao tempo de intervenção, ao número de animais e objetos inseridos no ambiente, assim como o tipo dos objetos e o tamanho do ambiente, se faz necessário a produção de novos estudos nessa área, a fim de esclarecer estes protocolos e resultados (Zhang, Yuan et al. 2021).

### **3 HIPÓTESE**

Verificar se o EA é capaz de modular positivamente o balanço oxidativo de camundongos fêmeas com 60 dias de vida em situações não patológicas.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os impactos do EA sobre indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas no fígado e músculo esquelético de camundongos fêmeas em idade juvenil.

#### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

##### **AVALIAR NO FÍGADO E MÚSCULO ESQUELÉTICO DE CAMUNDONGOS:**

- Indicadores de Estresse oxidativo (Malonaldeído e Carbonilas);
- Defesas antioxidantes enzimáticas (Superóxido Dismutase - SOD; Catalase e Glutathione S Transferase – GST);
- Defesas antioxidantes não enzimáticas (Glutathione reduzida – GSH; Glutathione Oxidada – GSSG; Estado REDOX – GSH/GSSG, Tióis Totais);
- Dimensionar a magnitude dos efeitos produzidos pelo enriquecimento ambiental sobre os marcadores de estresse oxidativo e peso corporal dos camundongos.

### **5 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem *C57BL/6* oriundos do biotério de criação do Instituto de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (iLIKA). 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 35 dias de vida, os camundongos foram randomicamente alocados em 2 grupos: **(G1)** Ambiente padrão (n = 11); **(G2)** Ambiente Enriquecido (n = 13) com duração de 3 semanas, seguindo as devidas recomendações para altura, largura e profundidade para os dois padrões ambientais.

## 5.2 ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL

Para intervir com o enriquecimento ambiental, inicialmente foi realizada a padronização do modelo para os camundongos *C57BL/6*. Este consistiu na adição de objetos inanimados capazes de produzir estimulação sensorial, cognitiva e locomotora, através do comportamento exploratório de 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 do ambiente padrão visando estabelecer maior capacidade de sociabilização. Sendo assim, em nosso trabalho, utilizou diferentes objetos de plástico (túneis, escadas, brinquedos), madeira (brinquedos e tocas) e rodas 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. Visando potencializar semanalmente o aumento na complexidade e variabilidade do ambiente, a cada semana a posição dos objetos era modificada, bem como seu número era aumentado a cada semana durante 3 semanas.



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

## 5.3 EUTANÁSIA, TECIDOS BIOLÓGICOS E MATERIAIS BIOLÓGICOS

Para eutanásia utilizaremos o cloridrato de Ketamina (0,1mL/ Kg) e Xylasina, (10 mg/Kg) com aplicação peritoneal para retirada do fígado, músculo esquelético extensor longo dos dedos (EDL) de ambas patas. Os tecidos serão homogeneizados em tampão de

extração (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; NP 40 (0,1%) e inibidores de protease).

#### **5.4 DOSAGEM DE PROTEÍNA**

A concentração de proteína da suspensão de cada tecido foi determinada pelo método de Bradford (Bradford 1976, He 2011). Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância será considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de albumina de soro bovino a 1% será utilizada como padrão.

### **6. BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO**

#### **6.1 MEDIDA DA SUBSTÂNCIA REATIVA AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)**

Para dosagem de malonaldeído (MDA) foi utilizada a técnica colorimétrica de Buege e Aust (1978), com finalidade de avaliar a peroxidação lipídica. Para isso, uma alíquota do homogenato de córtex pré-frontal e hipocampo 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<sup>0</sup> C. Após este processo, foi utilizada uma cubeta de vidro para leitura da absorbância a 535 nm. Os resultados foram expressos em milimoles por miligrama (mg) de proteína (Buege and Aust 1978).

#### **6.2 OXIDAÇÃO PROTEICA**

Para avaliação do nível de oxidação de proteínas foi realizada a análise de carbonilas descritas por Reznick e Packer (1994). Ao homogenato, 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 ressuspenso em 10mM de 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) e incubado em sala escura a temperatura ambiente por uma hora com agitações programadas a cada 15 minutos. Após período de 28 minutos de incubação, as amostras foram lavadas em tampão etil/acetato e centrifugadas três vezes e o pellet ressuspenso em 6M de hidrocloreto de guanidina, incubado por 30 minutos a 37°C e a absorbância verificada a 370nm. Os resultados foram expressos em  $\mu$ M/mg de proteína (Reznick and Packer 1994).

## **6.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE**

### **6.3.1 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).

### **6.3.2 CATALASE (CAT)**

A atividade da catalase (CAT) foi avaliada através da decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3mM. A absorbância foi analisada durante 3min e os resultados expressos em U/mg (Hugo and Lester 1984).

### **6.3.3 GLUTATIONA S TRANSFERASE (GST)**

Foi realizada a atividade da Glutationa-S-Transferase (GST) descrita 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-glutationa (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 Pubst 1974).

## **6.4 ATIVIDADE NÃO ENZIMÁTICA ANTIOXIDANTE**

### **6.4.1 GLUTATIONA 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. O estado redox foi determinado pela razão GSH/GSSG como previamente descrito (Hissin and Hilf 1976).

#### **6.4.2 SULFIDRILAS**

O conteúdo total e do grupo sulfidrilado 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).

#### **6.5 ASPÉCTOS ÉTICOS**

O presente estudo foi aprovado no Comitê de ética no uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), com número de protocolo 0051/2023. O cuidado com os animais seguiu as recomendações do *National Institutes of Health (NIH)*.

#### **6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

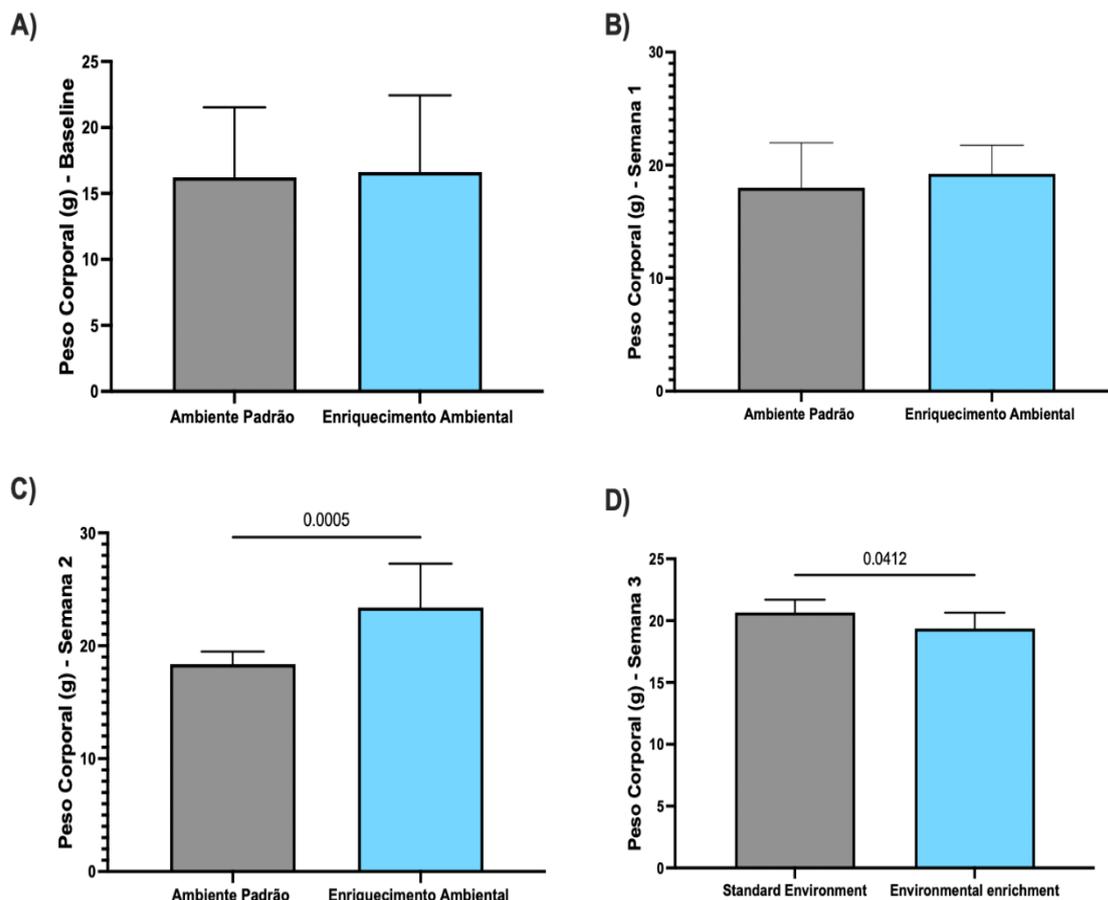
A análise exploratória dos dados foi associada ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. E seguida, a comparação entre os grupos foi realizada através do teste T *Student* não pareado ou U Mann-Whitney, a depender da distribuição normal. Por fim, para comprovação dos possíveis efeitos produzidos pelo 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). O valor de significância será estabelecido em  $p < 0.05$ , as análises serão realizadas através do software GraphPad Prisma v.9.

### **7 RESULTADOS**

#### **7.1 EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL NO PESO CORPORAL**

Inicialmente, analisamos os impactos do EA no peso corporal médio de camundongos fêmeas durante o período de três semanas de protocolo. Para verificar a homogeneidade do peso corporal entre os grupos, analisamos seus valores médios antes do início do protocolo de EA e não encontramos diferenças significativas (SE:  $16,23 \pm 5,30$ g vs EA:  $16,62 \pm 5,81$ ,  $p = 0,86$ ), (Figura 2A). Da mesma forma, após a primeira semana de intervenção com EA, não observamos significância (SE:  $18,00 \pm 3,97$  vs EA:  $19,23 \pm 2,52$ ,  $p = 0,38$ ), (Figura 2B). Após a segunda semana de intervenção, observamos

um aumento significativo no peso corporal no grupo EA, quando comparado ao SE (SE:  $18,36 \pm 1,12$  vs EA:  $23,38 \pm 3,38$ ,  $p = 0,0005$ ), (Figura 2C). Entretanto, ao final das 3 semanas do protocolo EA, observamos uma diminuição significativa no peso corporal no grupo EA quando comparado ao SE (SE:  $20,67 \pm 1,03$  vs EA:  $19,36 \pm 1,28$ ,  $p = 0,04$ ), (Figura 2D).

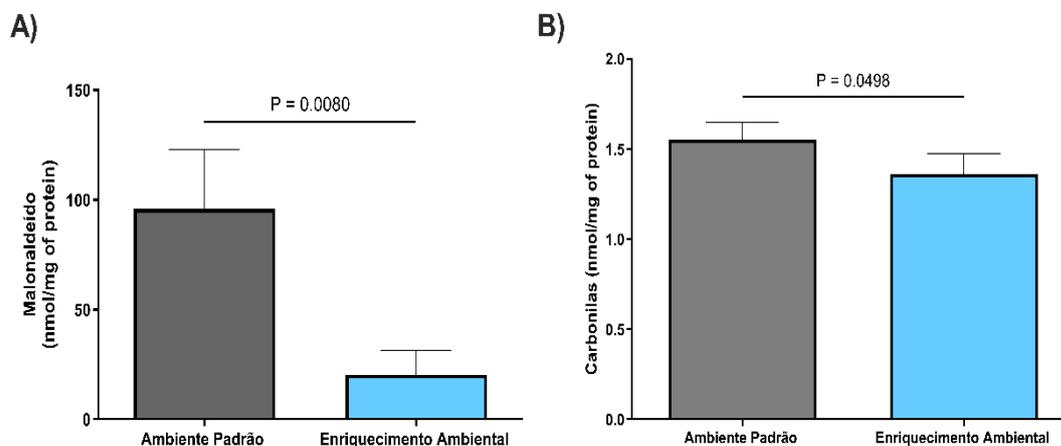


**Figura 2.** Dados sobre peso corporal médio de camundongos fêmeas durante as três semanas de enriquecimento ambiental. (A) Baseline (EA:  $n = 13$  e SE:  $n = 11$ ); (B) Semana 1 (EA:  $n = 13$  e SE:  $n = 11$ ); (C) Semana 2 (EA:  $n = 13$  e SE:  $n = 11$ ); (D) Semana 3 (EA:  $n = 11$  e SE:  $n = 6$ ).  $p = 0,86$ ;  $p = 0,38$ ;  $p = 0,0005$ ;  $p = 0,04$ .

## 7.2 EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO

Em seguida, avaliamos os efeitos de três semanas de EA nos biomarcadores de estresse oxidativo hepático. Ao analisar os níveis de malonaldeído (MDA), um indicador de peroxidação lipídica e dano celular, observamos que três semanas de EA foram capazes de diminuir significativamente os níveis de MDA quando comparado ao grupo SE (SE:  $95,77 \pm 27,08$  vs EA:  $20,19 \pm 11,14$ ,  $p = 0,0080$ ), (Figura 3A). Além disso,

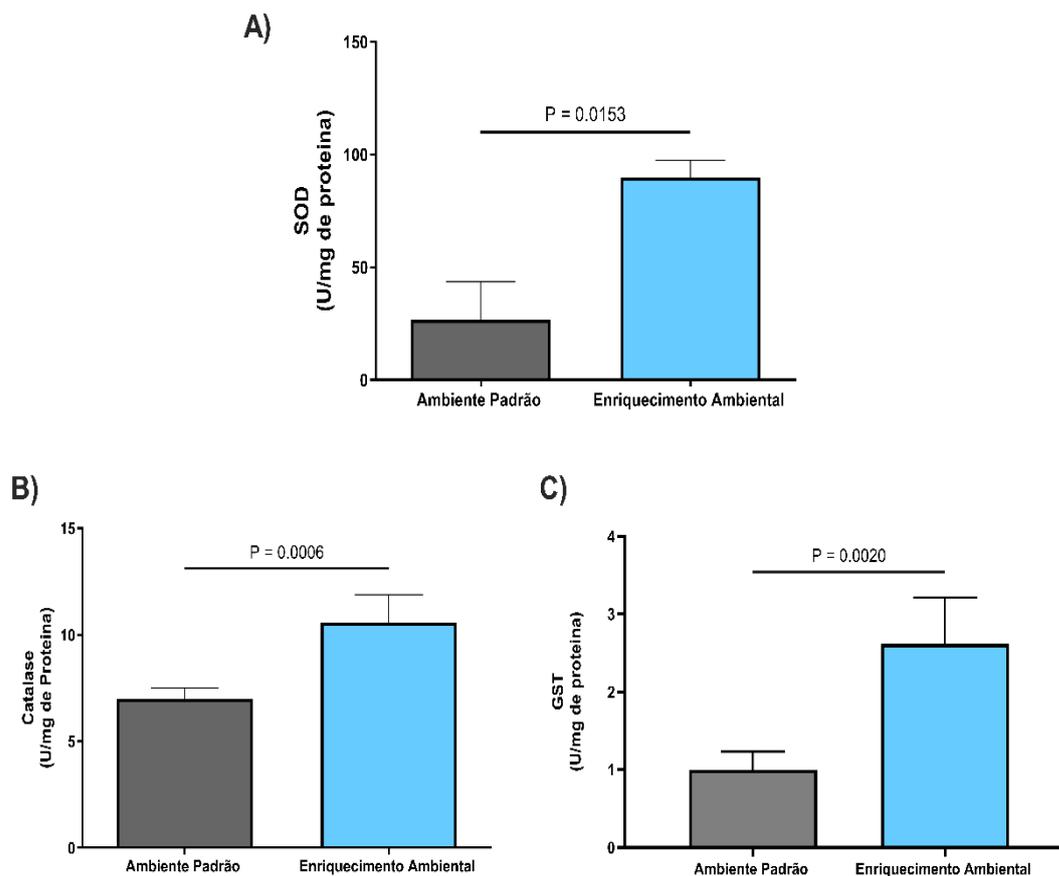
avaliamos carbonilas responsáveis pela oxidação de proteínas. O EA também reduziu significativamente os níveis de oxidação de proteínas quando comparado ao grupo SE (SE:  $1,55 \pm 0,09$  vs EA:  $1,36 \pm 0,11$ ,  $p = 0,0498$ ), (Figura 3B).



**Figura 3.** Dados sobre marcadores de estresse oxidativo hepáticos de camundongos fêmeas após três semanas de enriquecimento ambiental. (A) Malonaldeídos (SE:  $n = 4$  e EA:  $n = 7$ ); (B) Carbonilas (SE:  $n = 3$  e EA:  $n = 7$ ).  $p = 0,0080$ ;  $p = 0,0498$ .

### 7.3 EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA HEPÁTICA (SOD/CATALASE/GST)

Foi avaliado o efeito de três semanas de EA sobre a defesa antioxidante enzimática hepática. Ao analisar os níveis de SOD, observou-se que três semanas de EA foram capazes de aumentar significativamente os níveis de SOD quando comparado ao grupo SE (SE:  $26,16 \pm 16,80$  vs EA:  $89,83 \pm 7,679$ ,  $p = 0,0153$ ), (Figura 4A). Além disso, avaliou-se os níveis de Catalase (CAT). O EA também aumentou significativamente os níveis de CAT após 3 semanas de intervenção, quando comparado ao grupo SE (SE:  $6,989 \pm 0,4993$  vs EA:  $10,58 \pm 1,304$ ,  $p = 0,0006$ ), (Figura 4B). Por fim, foram avaliados os níveis de Glutathione S Transferase (GST). O EA, após 3 semanas, também foi capaz de aumentar significativamente os níveis de GST, quando comparado ao grupo SE (SE:  $0,9960 \pm 0,2361$  vs EA:  $2,616 \pm 0,5940$ ,  $p = 0,0020$ ), (Figura 4C).



**Figura 4.** Dados sobre atividade antioxidante enzimática hepática de camundongos fêmeas após três semanas de enriquecimento ambiental. (A) Superóxido Dismutase (SE: n = 3 e EA: n = 6); (B) Catalase (SE: n = 3 e EA: n = 6); (C) Glutathiona S Transferase (SE: n = 3 e EA: n = 5).  $p = 0,0153$ ;  $p = 0,0006$ ;  $p = 0,0020$ .

#### 7.4 EFEITOS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICA HEPÁTICA (GSSG/GSH/ESTADO REDOX)

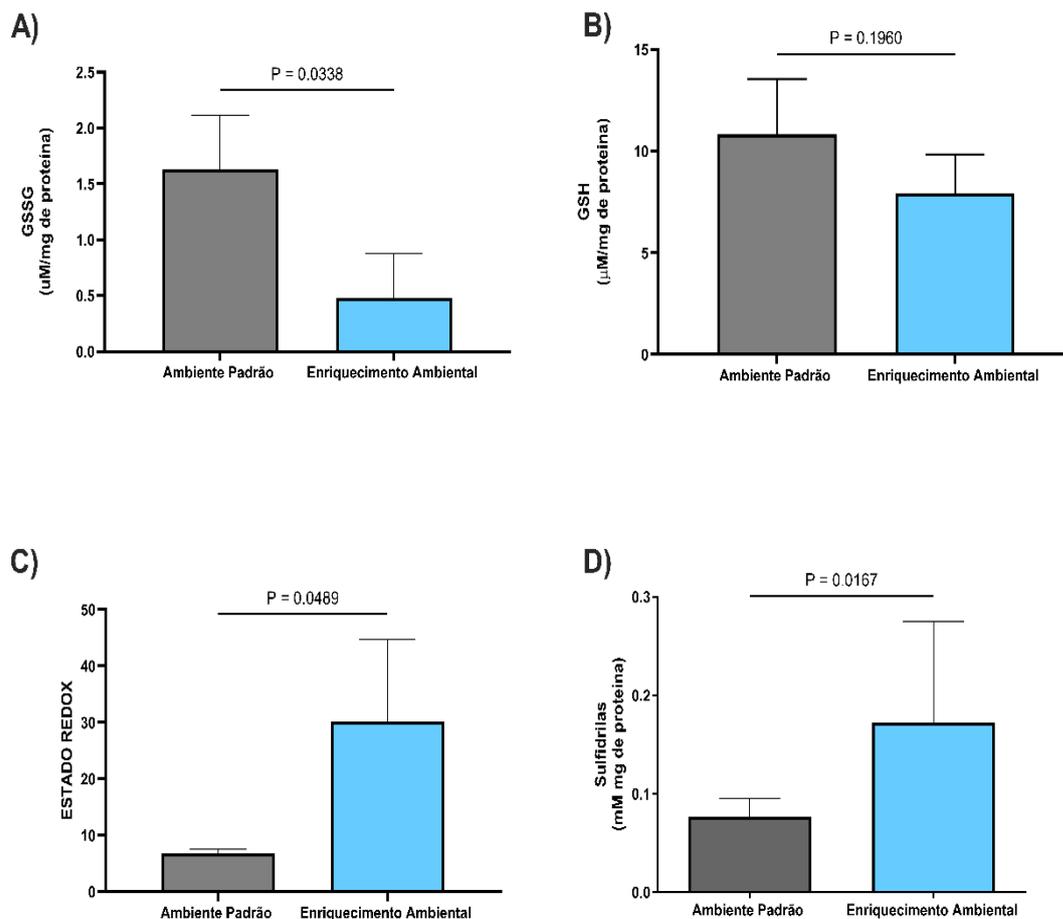
Foram avaliados os níveis de Glutathiona oxidada (GSSG) e Glutathiona Reduzida (GSH) no fígado. Após 3 semanas de EA, foi possível perceber uma diminuição significativa nos níveis de GSSG, quando comparado ao grupo SE (SE:  $1,627 \pm 0,4895$  vs EA:  $0,4819 \pm 0,3940$ ,  $p = 0,0338$ ), (Figura 5A). Além disso, também foi possível observar uma diminuição nos níveis de GSH do grupo EA, quando comparado ao grupo SE (SE:  $10,82 \pm 2,727$  vs EA:  $7,921 \pm 1,923$ ,  $p = 0,1960$ ), (Figura 5B).

O equilíbrio entre os níveis de GSSG e GSH é um indicador importante do estado redox da célula, sendo assim, também foi avaliado o estado redox após 3 semanas de EA, e foi possível perceber uma proporção significativamente elevada entre os níveis de

GSSG/GSH no grupo enriquecido, quando comparado ao grupo SE (SE:  $6,727 \pm 0,8388$  vs EA:  $30,13 \pm 14,62$ ,  $p = 0,0489$ ), (Figura 5C).

### 7.5 EFEITOS DO EA SOBRE OS NÍVEIS DE SULFIDRILAS NO FÍGADO

Posteriormente, foram avaliados os níveis de Sulfidrilas hepáticas. Após 3 semanas de EA, observou-se um aumento significativo nos níveis de Tióis totais no grupo enriquecido, quando comparado ao grupo SE (SE:  $0,07700 \pm 0,01852$  vs EA:  $0,1724 \pm 0,1027$ ,  $p = 0,0167$ ), (Figura 5D).

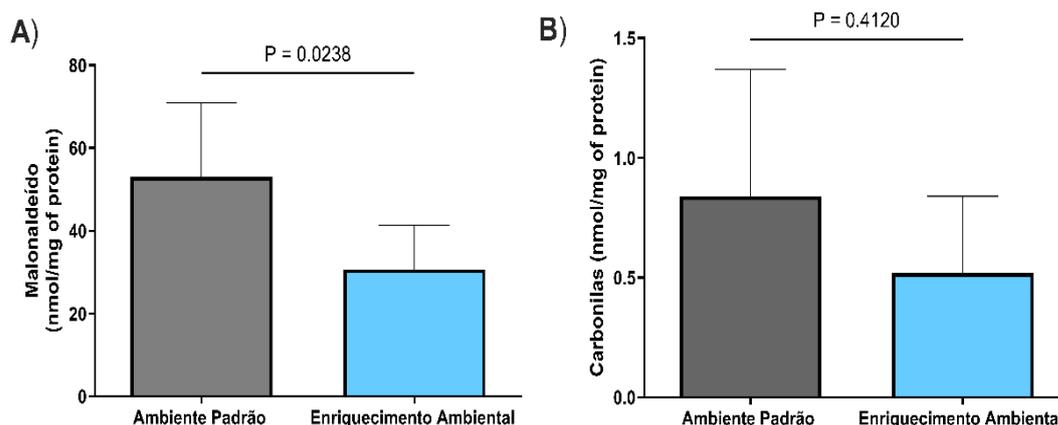


**Figura 5.** Dados sobre atividade antioxidante não enzimática hepática de camundongos fêmeas após três semanas de enriquecimento ambiental. (A) Glutaciona Oxidada (SE:  $n = 3$  e EA:  $n = 7$ ); (B) Glutaciona Reduzida (SE:  $n = 3$  e EA:  $n = 7$ ); (C) Estado Redox (SE:  $n = 3$  e EA:  $n = 4$ ); (D) Sulfidrilas (SE:  $n = 3$  e EA:  $n = 7$ ).  $p = 0,0338$ ;  $p = 0,1960$ ;  $p = 0,0489$ ;  $p = 0,0167$ .

### 7.6 EFEITOS DO EA SOBRE INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Em seguida, foram avaliados os efeitos de três semanas de EA nos biomarcadores de estresse oxidativo muscular, sendo mais específico, no Extensor longo

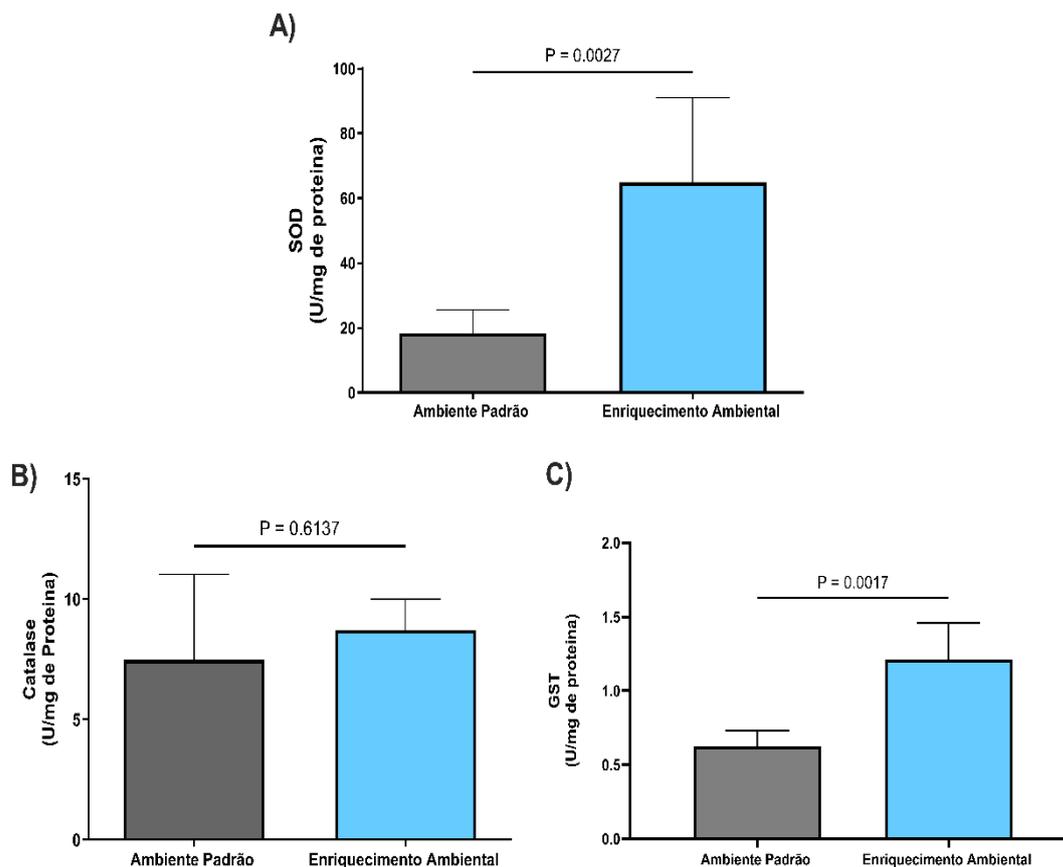
dos dedos (EDL). Ao analisar os níveis de malonaldeído (MDA), observamos que três semanas de EA foram capazes de diminuir significativamente os níveis de MDA quando comparado ao grupo SE (SE:  $52,99 \pm 17,87$  vs EA:  $30,67 \pm 10,59$ ,  $p = 0,0238$ ), (Figura 6A). Além disso, avaliamos as carbonilas. O EA também reduziu os níveis de oxidação de proteínas quando comparado ao grupo SE (SE:  $0,8393 \pm 0,5313$  vs EA:  $0,5180 \pm 0,3212$ ,  $p = 0,4120$ ), (Figura 6B).



**Figura 6.** Dados sobre marcadores de estresse oxidativo no músculo esquelético de camundongos fêmeas após três semanas de enriquecimento ambiental. (A) Malonaldeídos (SE:  $n = 3$  e EA:  $n = 6$ ); (B) Carbonilas (SE:  $n = 3$  e EA:  $n = 6$ ).  $p = 0,0238$ ;  $p = 0,4120$ .

## 7.7 EFEITOS DO EA SOBRE A DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Foi avaliado o efeito de três semanas de EA sobre a defesa antioxidante enzimática no músculo EDL. Ao analisar os níveis de SOD, observou-se que três semanas de EA foram capazes de aumentar significativamente os níveis, quando comparado ao grupo SE (SE:  $18,33 \pm 7,095$  vs EA:  $64,86 \pm 26,04$ ,  $p = 0,0027$ ), (Figura 7A). Além disso, avaliou-se os níveis de CAT. O EA aumentou os níveis de CAT após 3 semanas de intervenção, quando comparado ao grupo SE (SE:  $7,476 \pm 3,572$  vs EA:  $8,717 \pm 1,296$ ,  $p = 0,6137$ ), (Figura 7B). Por fim, foram avaliados os níveis de GST. O EA, após 3 semanas, também foi capaz de aumentar significativamente os níveis de GST, quando comparado ao grupo SE (SE:  $0,6273 \pm 0,1042$  vs EA:  $1,209 \pm 0,2488$ ,  $p = 0,0017$ ), (Figura 7C).



**Figura 7.** Dados sobre atividade antioxidante enzimática hepática de camundongos fêmeas após três semanas de enriquecimento ambiental. (A) Superóxido Dismutase (SE: n = 3 e EA: n = 7); (B) Catalase (SE: n = 3 e EA: n = 5); (C) Glutathione S Transferase (SE: n = 3 e EA: n = 6).  $p = 0,0027$ ;  $p = 0,6137$ ;  $p = 0,0017$ .

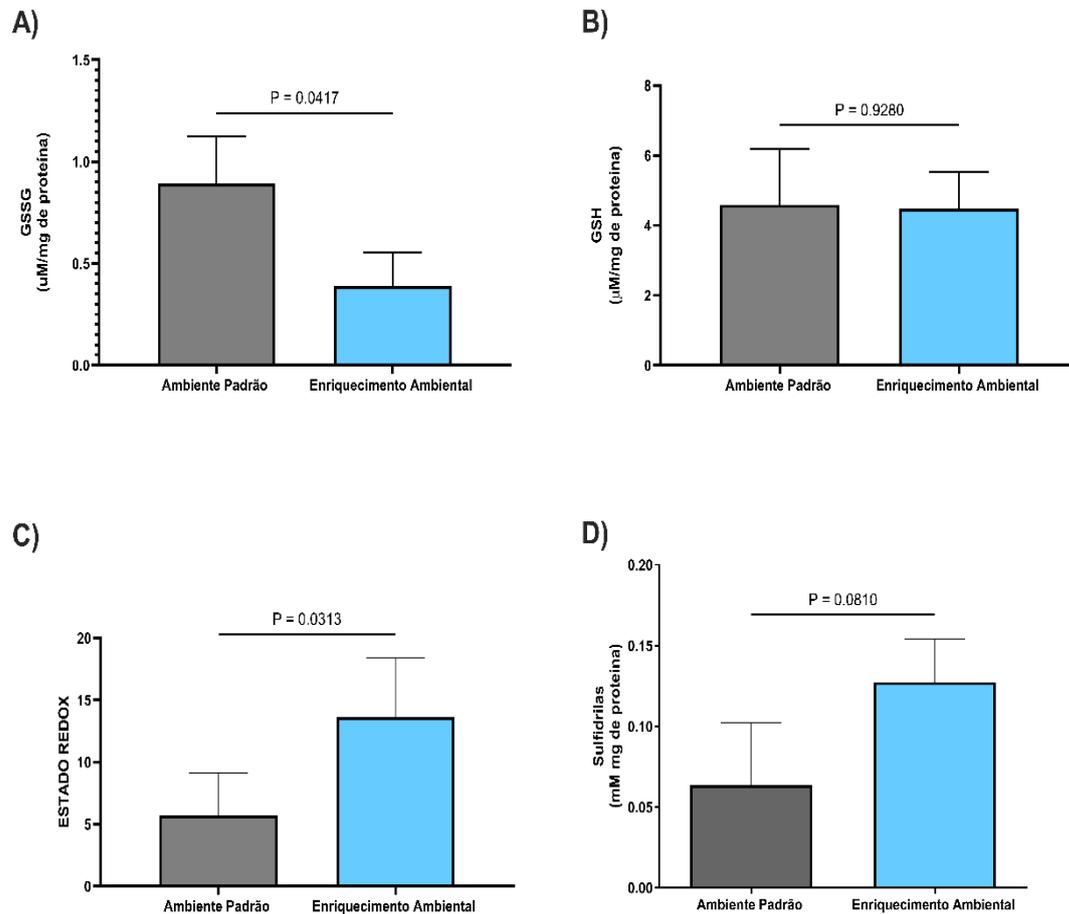
## 7.8 EFEITOS DO EA SOBRE A DEFESA ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

Foram avaliados os níveis de Glutathione oxidada (GSSG) e Glutathione Reduzida (GSH) no EDL. Após 3 semanas de EA, foi possível perceber uma diminuição significativa nos níveis de GSSG, quando comparado ao grupo SE (SE:  $0,8923 \pm 0,2307$  vs EA:  $0,3882 \pm 0,1643$ ,  $p = 0,0417$ ), (Figura 8A). Além disso, também foi possível observar uma diminuição nos níveis de GSH do grupo EA, quando comparado ao grupo SE (SE:  $4,586 \pm 1,597$  vs EA:  $4,487 \pm 1,037$ ,  $p = 0,9280$ ), (Figura 8B).

Visando verificar a proporção entre os níveis de GSSG/GSH no músculo, também foi avaliado o estado redox após 3 semanas de EA, e foi possível perceber uma proporção significativamente elevada entre os níveis de GSSG/GSH no grupo enriquecido, quando comparado ao grupo SE (SE:  $5,705 \pm 3,413$  vs EA:  $13,60 \pm 4,780$ ,  $p = 0,0313$ ), (Figura 8C).

## 7.9 EFEITOS DO EA SOBRE OS NÍVEIS DE SULFIDRILAS

Por fim, foram avaliados os níveis de Sulfidrilas. Após 3 semanas de EA, observou-se um aumento nos níveis de Tióis totais no grupo enriquecido, quando comparado ao grupo SE (SE:  $0,06333 \pm 0,03873$  vs EA:  $0,1274 \pm 0,02686$ ,  $p = 0,0810$ ), (Figura 8D).



**Figura 8.** Dados sobre atividade antioxidante não enzimática hepática de camundongos fêmeas após três semanas de enriquecimento ambiental. (A) Glutaciona Oxidada (SE:  $n = 3$  e EA:  $n = 6$ ); (B) Glutaciona Reduzida (SE:  $n = 3$  e EA:  $n = 7$ ); (C) Estado Redox (SE:  $n = 3$  e EA:  $n = 6$ ); (D) Sulfidrilas (SE:  $n = 3$  e EA:  $n = 5$ ).  $p = 0,0417$ ;  $p = 0,9280$ ;  $p = 0,0313$ ;  $p = 0,0810$ .

## **8 CÁLCULO DO TAMANHO DO EFEITO PRODUZIDO PELO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL SOBRE VARIÁVEIS LIGADAS AO BALANÇO OXIDATIVO HEPÁTICO E MUSCULAR ESQUELÉTICO, DEFESAS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICAS/NÃO ENZIMÁTICAS E PESO CORPORAL DOS CAMUNDONGOS**

Por fim, foi avaliado o tamanho do efeito produzido pelo enriquecimento ambiental nas variáveis de peso corporal, balanço oxidativo hepático e muscular, bem como a resposta antioxidante enzimática e não enzimática nestes mesmos tecidos (Tabelas 1-2). 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>
<b>Peso corporal (Baseline)</b>	16,23 ± 5,30	16,62 ± 5,81	0,06
<b>Peso corporal semana 1</b>	18,00 ± 3,97	19,23 ± 2,52	0,37
<b>Peso corporal semana 2</b>	18,36 ± 1,12	23,38 ± 3,38	<b>1,92</b>
<b>Peso corporal semana 3</b>	20,67 ± 1,03	19,36 ± 1,28	<b>1,08</b>
<b>Níveis de MDA</b>	95,77 ± 27,08	20,19 ± 11,14	<b>4,17</b>
<b>Níveis de Carbonilas</b>	1,55 ± 0,09	1,36 ± 0,11	<b>1,80</b>
<b>Níveis de SOD</b>	26,16 ± 16,80	89,83 ± 7,67	<b>5,74</b>
<b>Níveis de CAT</b>	6,98 ± 0,49	10,58 ± 1,30	<b>3,18</b>
<b>Níveis de GST</b>	0,99 ± 0,23	2,61 ± 0,59	<b>3,24</b>
<b>Níveis de GSSG</b>	1,62 ± 0,48	0,48 ± 0,39	<b>2,75</b>
<b>Níveis de GSH</b>	10,82 ± 2,72	7,92 ± 1,92	<b>1,32</b>
<b>Estado Redox</b>	6,72 ± 0,83	30,13 ± 14,62	<b>2,06</b>
<b>Níveis de Sulfidrilas</b>	0,07 ± 0,01	0,17 ± 0,10	<b>1,15</b>

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

**Tabela 2.** Efeito produzido por três semanas de EA no balanço oxidativo muscular esquelético.

<b>Variável</b>	<b>Ambiente Padrão</b>	<b>Enriquecimento Ambiental</b>	<b><i>Hedges'g</i></b>
<b>Níveis de MDA</b>	52,99 ± 17,87	30,67 ± 10,59	<b>1,70</b>
<b>Níveis de Carbonilas</b>	0,83 ± 0,53	0,51 ± 0,32	<b>0,81</b>
<b>Níveis de SOD</b>	18,33 ± 7,09	64,86 ± 26,04	<b>2,03</b>
<b>Níveis de CAT</b>	7,47 ± 3,57	8,71 ± 1,29	0,53
<b>Níveis de GST</b>	0,62 ± 0,10	1,20 ± 0,24	<b>2,76</b>
<b>Níveis de GSSG</b>	0,89 ± 0,23	0,38 ± 0,16	<b>2,79</b>
<b>Níveis de GSH</b>	4,58 ± 1,59	4,48 ± 1,03	0,08
<b>Estado Redox</b>	5,70 ± 3,41	13,60 ± 4,78	<b>1,78</b>
<b>Níveis de Sulfidrilas</b>	0,06 ± 0,03	0,12 ± 0,02	<b>2,52</b>

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

## 9 DISCUSSÃO

A presente dissertação teve como objetivo avaliar os impactos do EA sobre indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas no fígado e músculo esquelético de camundongos fêmeas com 60 dias de vida. Nossos resultados mostram que três semanas de EA foram eficazes na modulação do peso corporal, bem como na redução de indicadores relacionados a peroxidação lipídica e oxidativa proteica hepática e muscular esquelética. Além disso, foi observado que a exposição a esta ferramenta não farmacológica foi capaz de potencializar a atividade/níveis de defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas no fígado e músculo esquelético.

A princípio, avaliamos o peso corporal dos camundongos expostos ao EA, visto que ele é um importante indicador de saúde. Nesse sentido, nossos resultados apontam que o EA foi capaz de diminuir o peso corporal após três semanas de intervenção. Similarmente, Ratuski e Weary (2022) observaram uma diminuição no peso corporal de camundongos de laboratório expostos ao EA, eles sugeriram que a redução se deu por conta do aumento da atividade física e do gasto energético associado. Sabe-se que a redução do peso corporal ocorre perante múltiplos fatores, dentre eles o aumento na eficiência metabólica, que pode ser decorrente do aumento na prática de atividade física. Por exemplo, Van de Weerd et al. (1997) afirmaram que o EA estimula o comportamento natural dos animais, como explorar, correr, escalar e cavar, promovendo aumento nos níveis de atividade física. Nesse sentido, não ocorre melhoras apenas na condição física dos animais, mas também otimiza o metabolismo energético, ajudando no controle do peso corporal e na eficiência metabólica geral. Além disso, a literatura mostra que o aumento na atividade locomotora promovida pelo EA ativa mecanismos mitocondriais que contribuem para a redução da adiposidade e peso absoluto dos animais. Mohd et al. (2024) afirmaram que o EA estimula a biogênese mitocondrial em tecidos metabolicamente ativos, como o músculo esquelético, por exemplo. Resultando no aumento da capacidade oxidativa e eficiência metabólica, refletindo no gasto energético basal e peso corporal dos animais.

Posteriormente, avaliamos os níveis de biomarcadores de EO no fígado e músculo esquelético após três semanas de exposição ao EA, visando entender os efeitos fisiológicos e moleculares desta intervenção. A literatura mostra que o EA é capaz de

reduzir o estresse fisiológico e melhorar o bem-estar dos animais, uma vez que o EO está relacionado ao desbalanço entre a produção excessiva de ERO e a incapacidade de mecanismos antioxidantes do organismo em lidarem com isto, sendo assim, é considerável analisar se o EA consegue modular tal equilíbrio em tecidos metabolicamente ativos, como o fígado e músculo esquelético (Van Praag, Kempermann et al. 2000). O EA estimula meios adaptativos que aumentam a capacidade antioxidante, como a expressão das enzimas (SOD, CAT, Glutathione peroxidase), por exemplo. Verificar os níveis de biomarcadores como MDA (produto da peroxidação lipídica) e Carbonilas permite avaliar se existe melhora na resistência ao EO nesses tecidos (Sale, Berardi et al. 2014).

Sendo assim, após três semanas de intervenção, os níveis de MDA e Carbonilas diminuíram significativamente em ambos os tecidos. O estudo de Paules et al. (2024) encontrou resultados similares, onde o EA diminuiu os níveis destes biomarcadores e aumentou a resposta da defesa antioxidante hepática e muscular esquelética, prevenindo danos celulares. O fígado é um órgão importante tanto no metabolismo quanto na desintoxicação, fora isso, também é muito vulnerável ao dano oxidativo por conta de sua intensa atividade metabólica. Já o músculo esquelético, tem uma grande demanda energética, principalmente diante do esforço físico, o que o torna alvo frequente de ERO, podendo afetar a integridade celular e o desempenho funcional (Powers and Jackson 2008).

Além disso, avaliamos a resposta antioxidante enzimática e não enzimática hepática e muscular após três semanas de exposição ao EA, a fim de compreender se de fato o EA é capaz de modular o balanço oxidativo. Dito isto, após três semanas, percebemos um aumento significativo na resposta antioxidante enzimática e não enzimática em ambos os tecidos analisados. O estudo de Powers et al. (2022) encontrou um resultado semelhante. Segundo eles, a prática de atividade física como uma forma de enriquecimento pode ativar a via de sinalização do fator nuclear eritroide 2 (NRF2), que tem função de modular a defesa antioxidante celular. A ativação do mesmo no músculo esquelético e no fígado é comumente relacionado a uma expressão mais elevada de enzimas antioxidantes, como CAT e SOD, fora sua contribuição para homeostase mitocondrial e redução do EO. Além disso, em relação a defesa antioxidante não enzimática, foi observado no fígado que o EA promove melhorias nos níveis de GSSG/GSH, que são importantes moduladores de genes associados à biogênese

mitocondrial e ao metabolismo de lipídeos, promovendo melhoras na resposta antioxidante geral. Por fim, a literatura também mostra que no músculo esquelético o EA induz elevação na atividade de enzimas antioxidantes como SOD/CAT, melhorando a resistência e a recuperação muscular (Bucarey, Trujillo-González et al. 2024).

Por fim, foram avaliados os níveis de Sulfidrilas e o estado redox total no fígado e músculo esquelético de camundongos após três semanas de intervenção. O EA tem se mostrado uma ferramenta importante na modulação do balanço redox e níveis de sulfidrilas tanto no músculo esquelético quanto no fígado de camundongos, com efeitos positivos na defesa antioxidante. No fígado, o EA consegue melhorar o estado redox, elevando a disponibilidade de glutatona e influenciando positivamente o sistema de sulfidrilas, contribuindo para um ambiente menos propício a danos oxidativos. Tal efeito pode ser observado tanto pelo aumento na resposta das enzimas antioxidantes quanto na melhora do estado redox geral (Barboza 2015).

Além disso, essa ferramenta não farmacológica também promove melhor saúde muscular ao equilibrar e otimizar o balanço redox. O estudo de Zuo e Pannell (2015) indica que o músculo esquelético tira proveito direto dessa modulação, otimizando a resistência muscular e a recuperação após danos oxidativos. Nossos achados após três semanas foram semelhantes, mostrando aumento nos níveis de sulfidrilas e no estado redox total, sugerindo que a célula está num ambiente redutor saudável. Por isso, ressaltamos mais uma vez a importância do monitoramento desta relação, já que a mesma é crucial para avaliar a saúde celular (Zuo and Pannell 2015).

## **10 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS**

Sabe-se que o metabolismo é algo complexo, sendo assim, uma possível limitação do nosso trabalho é não ter avaliado parâmetros relacionados à expressão gênica, o que poderia enriquecer ainda mais os resultados obtidos após intervenção. Estudos futuros podem investigar a expressão de alguns genes relacionados ao metabolismo glicolítico, por exemplo, com a finalidade de esclarecer ainda mais os resultados obtidos. Outra perspectiva futura é associar a intervenção a algum desfecho fisiopatológico, como o câncer, por exemplo, para verificar os efeitos sobre condições adversas. Além disso, avaliamos apenas dois tecidos, mas como o EA é muito amplo na literatura, pode ser relevante estudos com outras análises e perspectivas.

## **11 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Por fim, o presente trabalho verificou os efeitos do EA sobre os indicadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas hepática e muscular esquelética em camundongos fêmeas em idade juvenil. Após três semanas de intervenção, observamos uma diminuição nos níveis de marcadores de EO, assim como um aumento na atividade da defesa antioxidante enzimática e não enzimática e nos níveis de sulfidrilas em ambos os tecidos analisados (fígado e EDL), contribuindo assim para um estado redox que indica uma boa saúde metabólica, sugerindo que os animais enriquecidos tem um meio celular redutor mais saudável do que os animais do grupo controle.

## 12 REFERÊNCIAS

- Fernandez, C., J. Collazo, Y. Bauza, M. Castellanos and O. Lopez (2004). "Environmental enrichment-behavior-oxidative stress interactions in the aged rat: issues for a therapeutic approach in human aging." Annals of the New York Academy of Sciences **1019**(1): 53-57.
- Cechetti, F., P. V. Worm, G. Lovatel, F. Moysés, I. R. Siqueira and C. A. Netto (2012). "Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat." Life sciences **91**(1-2): 29-36.
- Muhammad, M. S., R. A. Magaji, A. Mohammed, A.-S. Isa and M. G. Magaji (2017). "Effect of resveratrol and environmental enrichment on biomarkers of oxidative stress in young healthy mice." Metabolic brain disease **32**: 163-170.
- Harland, B. C. and J. C. Dalrymple-Alford (2020). "Enriched environment procedures for rodents: creating a standardized protocol for diverse enrichment to improve consistency across research studies." Bio-protocol **10**(11): e3637-e3637.
- Suzuki, A., M. Minamide, C. Iwaya, K. Ogata and J. Iwata (2020). "Role of metabolism in bone development and homeostasis." International journal of molecular sciences **21**(23): 8992.
- Ghoneum, A., A. Y. Abdulfattah, B. O. Warren, J. Shu and N. Said (2020). "Redox homeostasis and metabolism in cancer: a complex mechanism and potential targeted therapeutics." International journal of molecular sciences **21**(9): 3100.
- Beyfuss, K. and D. A. Hood (2018). "A systematic review of p53 regulation of oxidative stress in skeletal muscle." Redox Report **23**(1): 100-117.
- Sies, H. (2015). "Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine." Redox biology **4**: 180-183.

- Blanton, C., Z. He, K. T. Gottschall-Pass and M. I. Sweeney (2015). "Probiotics blunt the anti-hypertensive effect of blueberry feeding in hypertensive rats without altering hippuric acid production." PloS one **10**(11): e0142036.
- Mohajan, H. K. (2025). "A Study on Functions of Liver to Sustain a Healthy Liver." Innovation in Science and Technology **4**(1): 77-87.
- Silverthorn, D. U. (2017). Fisiologia humana: uma abordagem integrada, Artmed editora.
- Gelfand, D. W. (1980). "Anatomy of the liver." Radiologic Clinics of North America **18**(2): 187-194.
- Racanelli, V. and B. Rehermann (2006). "The liver as an immunological organ." Hepatology **43**(S1): S54-S62.
- Bismuth, H. (1986). Surgical anatomy of the liver. Therapeutic Strategies in Primary and Metastatic Liver Cancer, Springer: 179-184.
- Junqueira, L. C. and J. Carneiro (2022). Histología básica: texto y atlas, Editorial Médica Panamericana.
- Martins, P. N. A. and P. Neuhaus (2007). "Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat." Liver international **27**(3): 384-392.
- Kruepunga, N., T. B. Hakvoort, J. P. Hikspoors, S. E. Köhler and W. H. Lamers (2019). "Anatomy of rodent and human livers: What are the differences?" Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease **1865**(5): 869-878.
- Han, H.-S., G. Kang, J. S. Kim, B. H. Choi and S.-H. Koo (2016). "Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective." Experimental & molecular medicine **48**(3): e218-e218.
- Moreira, C. C. (2023). Simulação Numérica de um Implante Tibial e Previsão da Remodelação Óssea após a sua Inserção.
- Adeva-Andany, M. M., N. Pérez-Felpete, C. Fernández-Fernández, C. Donapetry-García and C. Pazos-García (2016). "Liver glucose metabolism in humans." Bioscience reports **36**(6): e00416.
- Carneiro, J. Y. (2020). "Histología Básica texto y Atlas."
- Cahill JR, G. F., J. Ashmore, A. S. Earle and S. Zottu (1958). "Glucose penetration into liver." American Journal of Physiology-Legacy Content **192**(3): 491-496.
- Jones, J. G. (2016). "Hepatic glucose and lipid metabolism." Diabetologia **59**(6): 1098-1103.

- Barrea, L., C. Di Somma, G. Muscogiuri, G. Tarantino, G. C. Tenore, F. Orio, A. Colao and S. Savastano (2018). "Nutrition, inflammation and liver-spleen axis." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **58**(18): 3141-3158.
- Lemieux, I. and J.-P. Després (2020). Metabolic syndrome: past, present and future, MDPI. **12**: 3501.
- Guyton Arthur, C. and E. Hall John (2006). "Tratado de fisiología médica." Editorial Elsevier Saunders. España.
- Farazi, P. A. and R. A. DePinho (2006). "Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment." Nature Reviews Cancer **6**(9): 674-687.
- Hawley, J. A. and J. J. Leckey (2015). "Carbohydrate dependence during prolonged, intense endurance exercise." Sports Medicine **45**: 5-12.
- Rezzani, R. and C. Franco (2021). Liver, oxidative stress and metabolic syndromes, MDPI. **13**: 301.
- Frontera, W. R. and J. Ochala (2015). "Skeletal muscle: a brief review of structure and function." Calcified tissue international **96**: 183-195.
- Børsheim, E. and R. Bahr (2003). "Effect of exercise intensity, duration and mode on post-exercise oxygen consumption." Sports medicine **33**: 1037-1060.
- Delbono, O., A. C. Z. Rodrigues, H. J. Bonilla and M. L. Messi (2021). "The emerging role of the sympathetic nervous system in skeletal muscle motor innervation and sarcopenia." Ageing research reviews **67**: 101305.
- Brooks, S. V. (2003). "Current topics for teaching skeletal muscle physiology." Advances in physiology education **27**(4): 171-182.
- Exeter, D. and D. A. Connell (2010). Skeletal muscle: functional anatomy and pathophysiology. Seminars in musculoskeletal radiology, © Thieme Medical Publishers.
- Richter, E. A. and M. Hargreaves (2013). "Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake." Physiological reviews.
- Mengeste, A. M., A. C. Rustan and J. Lund (2021). "Skeletal muscle energy metabolism in obesity." Obesity **29**(10): 1582-1595.
- Westerblad, H., J. D. Bruton and A. Katz (2010). "Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability." Exp Cell Res **316**(18): 3093-3099.
- Morgan, J. and T. Partridge (2020). "Skeletal muscle in health and disease." Disease models & mechanisms **13**(2): dmm042192.

- Gomes, M. J., P. F. Martinez, L. U. Pagan, R. L. Damatto, M. D. M. Cezar, A. R. R. Lima, K. Okoshi and M. P. Okoshi (2017). "Skeletal muscle aging: influence of oxidative stress and physical exercise." Oncotarget **8**(12): 20428.
- Distefano, G. and B. H. Goodpaster (2018). "Effects of exercise and aging on skeletal muscle." Cold Spring Harbor perspectives in medicine **8**(3): a029785.
- Paquot, N. (2019). "Le métabolisme de l'alcool." Revue médicale de Liege **74**(5-6).
- Nelson, D. L. and M. M. Cox (2022). Princípios de bioquímica de Lehninger, Artmed Editora.
- Jones, D. P. (2008). "Radical-free biology of oxidative stress." American Journal of Physiology-Cell Physiology **295**(4): C849-C868.
- Creczynski-Pasa, T. B. and R. V. Antônio (2004). "Energetic metabolism of *Chromobacterium violaceum*." Genetics and Molecular Research **3**(1): 162-166.
- McGlynn, S. E. (2017). "Energy metabolism during anaerobic methane oxidation in ANME archaea." Microbes and environments **32**(1): 5-13.
- Bonora, M., S. Patergnani, A. Rimessi, E. De Marchi, J. M. Suski, A. Bononi, C. Giorgi, S. Marchi, S. Missiroli and F. Poletti (2012). "ATP synthesis and storage." Purinergic signalling **8**: 343-357.
- Barbosa, K. B. F., N. M. B. Costa, R. d. C. G. Alfenas, S. O. De Paula, V. P. R. Minim and J. Bressan (2010). "Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios." Revista de nutrição **23**: 629-643.
- Lehninger, A. L. (2004). Lehninger Principles of Biochemistry: David L. Nelson, Michael M. Cox, Recording for the Blind & Dyslexic New York.
- Cox, M., A. Lehninger and D. Nelson (2006). "Princípios de bioquímica." São Paulo.
- Graham, H. and P. C. White (2016). "Social determinants and lifestyles: integrating environmental and public health perspectives." Public health **141**: 270-278.
- Love, C. J., C. Gubert, T. Renoir and A. J. Hannan (2022). "Environmental enrichment and exercise housing protocols for mice." STAR protocols **3**(4): 101689.
- Crofton, E. J., Y. Zhang and T. A. Green (2015). "Inoculation stress hypothesis of environmental enrichment." Neuroscience & Biobehavioral Reviews **49**: 19-31.
- Simpson, J. and J. P. Kelly (2011). "The impact of environmental enrichment in laboratory rats—behavioural and neurochemical aspects." Behavioural brain research **222**(1): 246-264.
- Ismail, T. R., C. G. Yap, R. Naidu and N. Pamidi (2021). "Enrichment protocol for rat models." Current protocols **1**(6): e152.

- Lambert, T. J., S. M. Fernandez and K. M. Frick (2005). "Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice." Neurobiology of learning and memory **83**(3): 206-216.
- Bayne, K. (2018). "Environmental enrichment and mouse models: Current perspectives." Animal models and experimental medicine **1**(2): 82-90.
- Hobbiesiefken, U., P. Mieske, L. Lewejohann and K. Diederich (2021). "Evaluation of different types of enrichment-their usage and effect on home cage behavior in female mice." PloS one **16**(12): e0261876.
- Speck, M. L., A. L. A. Gomes, C. S. Rojas, J. B. Willig, A. P. Herrmann, D. A. Pilger and S. M. K. Rates (2023). "Environmental enrichment affects behavioral and pharmacological response to antidepressants in CF1 mice." Neuroscience Letters **813**: 137432.
- Zhang, X., M. Yuan, S. Yang, X. Chen, J. Wu, M. Wen, K. Yan and X. Bi (2021). "Enriched environment improves post-stroke cognitive impairment and inhibits neuroinflammation and oxidative stress by activating Nrf2-ARE pathway." International Journal of Neuroscience **131**(7): 641-649.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical biochemistry **72**(1-2): 248-254.
- He, F. (2011). "Bradford protein assay." Bio-protocol: e45-e45.
- Buege, J. A. and S. D. Aust (1978). [30] Microsomal lipid peroxidation. Methods in enzymology, Elsevier. **52**: 302-310.
- Reznick, A. Z. and L. Packer (1994). "[38] Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay." Methods in enzymology **233**: 357-363.
- Misra, H. P. and I. Fridovich (1972). "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase." Journal of Biological chemistry **247**(10): 3170-3175.
- Hugo, A. and P. Lester (1984). "Catalase in vitro." Methods in enzymology **105**: 121-126.
- Habig, W. and M. Pust (1974). "Jokoby. GST, the first enzyme step in mercaptone acid formation." J Bio Chem **249**: 7130-7139.
- Hissin, P. J. and R. Hilf (1976). "A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues." Analytical biochemistry **74**(1): 214-226.

- Aksenov, M. Y. and W. R. Markesbery (2001). "Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease." Neuroscience letters **302**(2-3): 141-145.
- Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." Archives of biochemistry and biophysics **82**(1): 70-77.
- Walmsley, T., M. Abernethy and H. Fitzgerald (1987). "Effect of daylight on the reaction of thiols with Ellman's reagent, 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)." Clinical chemistry **33**(10): 1928-1931.
- Ratuski, A. S. and D. M. Weary (2022). "Environmental enrichment for rats and mice housed in laboratories: a metareview." Animals **12**(4): 414.
- Van de Weerd, H., P. Van Loo, L. Van Zutphen, J. Koolhaas and V. Baumans (1997). "Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice." Laboratory animals **31**(2): 133-143.
- Mohd Sahini, S. N., N. A. Mohd Nor Hazalin, B. N. Srikumar, H. S. Jayasingh Chellammal and G. K. Surindar Singh (2024). "Environmental enrichment improves cognitive function, learning, memory and anxiety-related behaviours in rodent models of dementia: Implications for future study." Neurobiol Learn Mem **208**: 107880.
- Van Praag, H., G. Kempermann and F. H. Gage (2000). "Neural consequences of environmental enrichment." Nature Reviews Neuroscience **1**(3): 191-198.
- Sale, A., N. Berardi and L. Maffei (2014). "Environment and brain plasticity: towards an endogenous pharmacotherapy." Physiological reviews **94**(1): 189-234.
- Bucarey, J. L., I. Trujillo-González, E. M. Paules and A. Espinosa (2024). "Myokines and Their Potential Protective Role Against Oxidative Stress in Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD)." Antioxidants **13**(11): 1363.
- Powers, S. K. and M. J. Jackson (2008). "Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production." Physiological reviews **88**(4): 1243-1276.
- Powers, S. K., E. Goldstein, M. Schragger and L. L. Ji (2022). "Exercise training and skeletal muscle antioxidant enzymes: An update." Antioxidants **12**(1): 39.
- Barboza, T. E. (2015). Efeito do enriquecimento ambiental sobre o perfil cardiometabólico e estresse oxidativo no músculo e coração em ratos jovens e idosos, Universidade de São Paulo.
- Zuo, L. and B. K. Pannell (2015). "Redox Characterization of Functioning Skeletal Muscle." Frontiers in Physiology **6**.

## 13 ATIVIDADES EM PARALELO

Por fim, segue em anexo algumas das publicações feitas ao longo do período do curso:

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 in Neuroscience

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

Check for updates

**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  
Paritaj Bhatia,  
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  
Fabrício Oliveira Souto  
✉ fabricio.souto@ufpe.br

<sup>†</sup>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 Ramos<sup>1</sup>, Matheus Santos de Sousa Fernandes<sup>1,2</sup>,  
 Débora Eduarda da Silva Fidélis<sup>1</sup>,  
 Gabriela Carvalho Jurema Santos<sup>3</sup>, Renata B. Albuquerque<sup>1,2</sup>,  
 Diorginis José Soares Ferreira<sup>4</sup>, Raphael Fabricio de Souza<sup>5</sup>,  
 Georgian Badicu<sup>6\*</sup>, Fatma Hilal Yagin<sup>7\*</sup>, Burak Yagin<sup>7\*</sup>,  
 Reem M. Alwhaibi<sup>8</sup>, Fabrício Oliveira Souto<sup>1,2\*</sup> and  
 Cláudia Jacques Lagranha<sup>9†</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, <sup>2</sup>Instituto Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, <sup>4</sup>Physical Education Department/Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, Pernambuco, Brazil, <sup>5</sup>Department of Physical Education, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brazil, <sup>6</sup>Department of Physical Education and Special Motricity, Transilvania University of Braşov, Braşov, Romania, <sup>7</sup>Department of Biostatistics and Medical Informatics, Faculty of Medicine, Inonu University, Malatya, Turkey, <sup>8</sup>Department of Rehabilitation Sciences, College of Health and Rehabilitation Sciences, Princess Nourah Bint Abdulrahman University, Riyadh, Saudi Arabia, <sup>9</sup>Programa 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.

Frontiers in Neuroscience
01
frontiersin.org

2 – Comment on “Are family meals and social eating behaviour associated with depression, anxiety, and stress in adolescents?” *Clinical Nutrition* 2023: [https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261-5614\(23\)00128-0/fulltext](https://www.clinicalnutritionjournal.com/article/S0261-5614(23)00128-0/fulltext)

Clinical Nutrition 42 (2023) 1233–1234



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Nutrition

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



Letter to the Editor

Comment on “Are family meals and social eating behaviour associated with depression, anxiety, and stress in adolescents?” *Clinical nutrition* 2023



**Keywords:**  
Food intake  
Feeding  
Psychiatric disorders  
Health

Dear editor,

Initially we congratulate Victoria et al. [1] for conducting this exceptional study, which aimed to verify the possible association between family meals, social eating with symptoms of depression, anxiety, and stress in adolescents. It is known that the emergence and development of pathologies related to mental health is multifactorial, among which are social, genetic, environmental, cultural, and economic factors. First, we highlight the fact that this study analyzed the social impacts and family meals with depressive behavior and anxiety in adolescents, since these mental disorders have a higher prevalence and cause disability [1]. Anxiety and depression disorders are frequent in adolescence, therefore, identifying which factors favor the possible attenuation and/or worsening of these conditions are of paramount importance, contributing to the development of preventive and treatment strategies. Therefore, we suggest that studies with this target audience should be increasingly encouraged [2].

Illnesses related to eating behavior (ED) have also occurred at an alarming rate in adolescence. Thus, what called our attention was the fact that the study emphasized that social factors (family, friends, media) are capable of modulating eating behavior in this population. To follow society's standards, adolescents create feelings and emotions associated with food intake, which in turn can change their body image. On the other hand, the establishment of positive emotional experiences and adequate eating behavior can prevent the development of diseases such as anxiety and depression [3]. These diseases are increasingly prevalent in society, as much as pharmacological treatment is considered the first way of intervention, many people do not suit it. Therefore, we suggest that future interventions analyze more factors in addition to social ones, such as environmental, economic, and cultural ones, to obtain more results that can contribute to the prevention of these diseases [4].

We would also like to point out that several studies have already verified the association between family meals and depression,

anxiety, or stress. However, this was the only study that verified the association between social eating behavior in adolescents, which is why it became so important/innovative. However, the results regarding frequency of family meals and social eating behavior were self-reported, which reduces the accuracy of the data. We suggest that further studies seek to verify these points with more attention and strictness, to obtain more reliable results [1]. Finally, we highlight once again the relevant contribution of the study by Victoria et al. to the scientific community, and we ratify our suggestions for future studies.

**Author contributions**

TRL, LFDs, and MSSF: concept, interpretation, writing of the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript for important intellectual content and approved the final version of the manuscript.

**Financial support**

None.

**Conflict of interest**

None.

**Acknowledgements**

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

**References**

- [1] Victoria-Montesinos D, et al. Are family meals and social eating behaviour associated with depression, anxiety, and stress in adolescents? *Clin Nutr* 2023;42(4):505–10. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2023.01.020>.
- [2] Schniering CA, et al. Online treatment of adolescents with comorbid anxiety and depression: a randomized controlled trial. *J Affect Disord* 2022;311:88–94.
- [3] Hay P. Current approach to eating disorders: a clinical update. *Intern Med J* 2020;50(1):24–9.
- [4] Bhattacharya A, DeFilipp L, Timko CA. Feeding and eating disorders. *Handb Clin Neurol* 2020;175:387–403.

Tiago Lacerda Ramos

Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde,  
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2023.04.015>

0261-5614/© 2023 Elsevier Ltd and European Society for Clinical Nutrition and Metabolism. All rights reserved.

3 - RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA MICROBIANA: UM OLHAR DA SAÚDE ÚNICA. VOLUME 1. 2024:

Capítulo 4

PRINCIPAIS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA DE *Acinetobacter baumannii* ..... 70

Adriano Fábio de Lima  
Esaú Simões da Silva  
Débora Eduarda da Silva Fidelis  
Tiago Lacerda Ramos  
Hanne Lazla Rafael de Queiroz Macêdo  
Luís André de Almeida Campos  
Isabella Macário Ferro Cavalcanti  
DOI 10.46898/rfb.9786558898962.4