UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

MARIA CAROLINA CAVALCANTI DE LIMA

EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM POLIFENÓIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO MOTOR DE RATOS

RECIFE

2022

MARIA CAROLINA CAVALCANTI DE LIMA

EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM POLIFENÓIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO MOTOR DE RATOS

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição

Orientadora: Profª. Dra. Gisélia de Santana Muniz

Co-orientadora: Erika Vanesa Cadena Burbano

RECIFE

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Lima, Maria Carolina Cavalcanti de .
Efeitos do tratamento neonatal com polifenóis sobre o desenvolvimento motor de ratos / Maria Carolina Cavalcanti de Lima. - Recife, 2022.
35 p : il., tab.

Orientador(a): Gisélia de Santana Muniz
Cooorientador(a): Erika Vanesa Cadena Burbano
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Nutrição - Bacharelado, 2022.
Inclui referências, anexos.

1. Atividade Locomotora. 2. Polifenóis. 3. Kaempferol. 4. Resveratrol. I. Muniz, Gisélia de Santana. (Orientação). II. Burbano, Erika Vanesa Cadena. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

MARIA CAROLINA CAVALCANTI DE LIMA

EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM POLIFENÓIS SOBRE O DESENVOLVIMENTO MOTOR DE RATOS

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição

Aprovado em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Profª. Elizabeth do Nascimento

Profª. Ana Paula Rocha de Melo

Profª. Erika Vanesa Cadena Burbano

À minha mãe, por iluminar todos os dias da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar ao meu lado mesmo quando eu quis acreditar no contrário. Por me ouvir e por me ajudar a enxergar a beleza de tudo o que me rodeia.

À minha mãe Maria, por guiar meus passos, apoiar minhas decisões e celebrar minhas conquistas. Por dividir a vida comigo, compartilhar saberes e sonhos e sempre encontrar uma forma de me fazer sorrir. Estivemos e sempre estaremos juntas.

Ao meu avô Amaro, por ter dedicado tanto tempo e esforço para me ver crescer bem. Por me contar ótimas histórias e piadas, por me ensinar sobre o tempo, sobre o valor da educação, da paciência e de ter consciência de classe. Por me encher de carinho de todas as formas possíveis e ser a minha principal referência de paternidade. E, apesar de não estar mais aqui fisicamente, seu amor vive em mim e me dá forças para seguir e acreditar que um dia nos encontraremos novamente.

À minha avó Josefa, por ser rede de apoio para minha mãe, por me dar amor desde o primeiro momento e me ensinar, com seu jeito particular, sobre a importância de perceber o verdadeiro valor das relações.

À minha orientadora Gisélia Muniz, por todo o apoio, paciência e ensinamentos. Agradeço, também, à minha co-orientadora Erika Cadena, por me acolher, ensinar e incentivar. Por todos os momentos no biotério, onde sua presença fazia tudo parecer mais tranquilo e acolhedor. Sua força é inspiradora.

Agradeço aos profissionais, nutricionistas ou não, que encontrei durante essa jornada e me fizeram sentir que estava no caminho certo: Karolyne Mota e toda a equipe do NASF Capibaribe, Carmem Burgos, Lizelda Araújo, Luana Paiva, Michele Tito, Clarissa Barreto, Andresa Monte, Karynne Vieira, Synara Soares e toda a equipe da GGEAL. Vocês sempre estarão em meu coração.

Por último, mas não menos importante, agradeço imensamente aos meus amigos: Alvaro Nascimento, Diego Lopes, Renata Oliveira, Riclenya Paulina e Williane Miranda, por tornarem a vida mais leve e divertida. Agradeço por todo o suporte, carinho e parceria. A gente tinha que se encontrar.

RESUMO

O desenvolvimento motor dos animais mamíferos passa por vários estágios, inclusive após o nascimento. As modificações do ambiente exercem grande influência sobre esse e outros quesitos, sendo a nutrição um fator extremamente relevante. O uso de polifenóis tem sido bastante relatado por apresentar efeitos benéficos à saúde, de forma a prevenir e tratar doenças. O objetivo deste trabalho foi avaliar as ações dos polifenóis resveratrol e kaempferol no desenvolvimento motor de ratos jovens. Foram utilizados 48 ratos machos da linhagem *Wistar*, igualmente divididos em 3 grupos, de acordo com o polifenol ou o veículo utilizado: Grupo Veículo Dimetilsulfóxido (n=16), Grupo Kaempferol (n=16) e Grupo Resveratrol (n=16). Para a administração dos fármacos, o peso dos animais foi aferido diariamente do 1° ao 21° dia pós-natal (DPN), sendo utilizada dosagem de 1 mg/Kg para os grupos experimentais e o dimetilsulfóxido a 1% para o grupo controle, aplicados por via intraperitoneal diariamente durante todo o período de lactação. Para a avaliação do desenvolvimento motor, foi utilizado o teste de campo aberto, realizado nos dias 8°, 14°, 17° e 21°. Os dados foram expressos como média e ± EP. Foi realizado o teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Para as variáveis que passaram no teste de normalidade, foram utilizados testes paramétricos ANOVA correspondentes (one ou two-way com ou sem medidas repetidas) com pós-teste de Tukey. Os dados foram analisados no programa GraphPad Prism 6. Foi considerado significante o valor de $p<0,05$. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo CEUA/UFPE n° 0052/2019. O grupo kaempferol apresentou maior peso corporal em relação ao grupo veículo ($p<0,01$) nos dias 19° e 21°. Analisando a atividade locomotora, os animais do grupo resveratrol percorreram uma distância maior ($p<0,001$ no DPN17 e $p<0,01$ no DPN21), bem como apresentaram maiores energia cinética e potência média em relação tanto ao grupo controle (DPN21 $p<0,05$ e $p<0,0001$, respectivamente) quanto em relação ao grupo kaempferol (DPN21 $p<0,05$ e $p<0,0001$, respectivamente). Relativo ao tempo de imobilidade, o grupo resveratrol apresentou menor tempo em relação ao grupo veículo nos dias 17 e 21 ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente). Os animais do grupo resveratrol apresentaram menor número de paradas em relação aos grupos controle e kaempferol nos dias 8 ($p<0,05$, para ambos) e 14 ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente). Neste estudo, o grupo resveratrol se mostrou mais ativo e percorreu uma distância maior. O uso do kaempferol não apresentou efeitos significativos sobre a atividade motora.

Palavras-chave: Atividade Locomotora. Polifenóis. Resveratrol. Kaempferol.

ABSTRACT

The motor development of mammals goes through several stages, including after birth. Changes in the environment have a great influence on this and other issues, with nutrition being an extremely relevant factor. The use of polyphenols has been widely reported as having beneficial effects on health, in order to prevent and treat diseases. The objective of this study was to evaluate the actions of the polyphenols resveratrol and kaempferol on the motor development of young rats. Forty-eight male Wistar rats were used, equally divided into 3 groups, according to the polyphenol or vehicle used: Vehicle Dimethylsulfoxide Group (n=16), Kaempferol Group (n=16) and Resveratrol Group (n=16). For the administration of polyphenols and vehicle, the weight of the animals was measured daily from the 1st to the 21st postnatal day (PND), 1 mg/kg dosage was used for the experimental groups and 1% dimethyl sulfoxide for the control group, applied intraperitoneally daily throughout the lactation period. For the evaluation of motor development, the open field test was used, performed on the 8th, 14th, 17th and 21st days. Data were expressed as mean and ± EP. The D'Agostino-Pearson normality test was performed. For variables that passed the normality test, corresponding ANOVA parametric tests were used (one or two-way with or without repeated measures) with Tukey's post-test. Data were analyzed using the GraphPad Prism 6 program. A value of $p<0.05$ was considered significant. The experimental protocols were approved by the CEUA/UFPE nº 0052/2019. The kaempferol group had higher body weight compared to the vehicle group ($p<0.01$) on the 19th and 21st days. Analyzing locomotor activity, the animals in the resveratrol group covered a greater distance ($p<0.001$ in DPN17 and $p<0.01$ in DPN21), as well as having higher kinetic energy and average power in relation to both the control group (DPN21 $p<0$, 05 and $p<0.0001$, respectively) and in relation to the kaempferol group (DPN21 $p<0.05$ and $p<0.0001$, respectively). Regarding immobility time, the resveratrol group had a shorter time compared to the vehicle group on days 17 and 21 ($p<0.01$ and $p<0.05$, respectively). The animals in the resveratrol group had fewer stops than the control and kaempferol groups on days 8 ($p<0.05$, for both) and 14 ($p<0.001$ and $p<0.05$, respectively). In this study, the resveratrol group was more active and covered a greater distance. On the other hand, the use of kaempferol had no significant effects on motor development.

Key words: Locomotive Activity. Polyphenols. Resveratrol. Kaempferol.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 JUSTIFICATIVA 13

3 REVISAO DA LITERATURA 14

3.1 DESENVOLVIMENTO MOTOR 14

3.2 POLIFENÓIS 15

3.2.1 Kaempferol 16

3.2.2 Resveratrol 17

3.3 POLIFENÓIS E DESENVOLVIMENTO MOTOR 18

4 OBJETIVOS 19

4.1 OBJETIVO GERAL 19

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19

5 MATERIAIS E MÉTODOS 20

5.1 Questões éticas 20

5.2 Animais 20

5.3 Desenho experimental 21

5.4 Utilização dos polifenóis 21

5.5 Avaliação do peso corporal 21

5.6 Atividade locomotora 21

5.7 Análise estatística 22

6 RESULTADOS 23

7 DISCUSSÃO 27

8 CONCLUSÃO 30

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 31

ANEXOS 35

Anexo 1 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE 35

1 INTRODUÇÃO

O crescimento durante o período pós-natal é o resultado do desenvolvimento de complexos mecanismos funcionais, estruturais e metabólicos. O organismo dos mamíferos não está totalmente desenvolvido logo após o nascimento, sua maturação continua durante o período pós-natal imediato (PATEL; SRINIVASAN, 2010). Este período de imaturidade é caracterizado por possuir grande plasticidade, permitindo que os indivíduos se adaptem ao ambiente que os cerca, sendo, portanto, considerado um período crítico para o desenvolvimento, ou seja, nestes momentos os circuitos neurais estão mais susceptíveis a modificações na sua estrutura e função em decorrência de estímulos ambientais (HENSCH, 2005).

O sistema nervoso central (SNC) apresenta um alto grau de organização estrutural e funcional. Esta organização é resultado de um complexo desenvolvimento, uma série construtiva de eventos, envolvendo o crescimento e maturação de células e sua organização em estruturas funcionais ou núcleos, gerando funções fisiológicas (BÂ; SERI, 1995). Com base nisso, o desenvolvimento do sistema motor também passa por vários estágios e depende tanto de fatores genéticos quanto epigenéticos, ocorrendo de forma não linear (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993b), necessitando da maturação e integração entre o SNC e o sistema musculoesquelético.

A nutrição influencia substancialmente nos processos de desenvolvimento, estruturação e na função cerebral, pois esta fornece os componentes adequados para o cérebro criar e manter conexões. Os fatores dietéticos possuem uma ampla e positiva ação na função neuronal e na plasticidade (MEEUSEN, 2014). A partir disso, o interesse acerca da existência de componentes presentes nos alimentos que podem ter efeitos benéficos para a saúde, aumentou substancialmente. Dentre esses componentes, destacam-se os polifenóis, que são compostos orgânicos caracterizados pela presença de múltiplas unidades estruturais de fenol, encontrados em alimentos de origem vegetal como frutas, chás, café e vinho tinto (SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005).

O resveratrol (3,5,4’-trihidroxi-trans-etileno) é um polifenol pertencente à família das fitoalexinas, encontrado em sementes de várias espécies de plantas, incluindo amendoim e uvas, estando presente, também, nos seus derivados como o vinho tinto. O resveratrol demonstrou ter propriedades antioxidantes significativas e

atua como um agente neuroprotetor, podendo apresentar efeitos na musculatura esquelética (SÖNMEZ, Ü. *et al.*, 2007). Entretanto, ainda não há um consenso sobre a dose dietética adequada.

Outro polifenol bastante estudado é o kaempferol (3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil), ele é um flavonoide encontrado em muitos produtos naturais como feijão, pólen de abelha, brócolis, repolho, alcaparras, couve-flor, sementes de chia, cebolinha, cominho, folha de moringa, endívia, erva-doce e alho (IMRAN et al 2019). Assim como o resveratrol, o kaempferol também possui efeitos protetores para a saúde humana, incluindo atividades antioxidante, antiiflamatóra, hipoglicêmico, hipolipidêmico, entre outras (YANG, Yan *et al.*, 2022).

Desta maneira, este trabalho buscou avaliar os efeitos do tratamento neonatal com os polifenóis resveratrol e kaempferol sobre o desenvolvimento motor dos animais.

2 JUSTIFICATIVA

Esta pesquisa justifica-se pela ausência de estudos na literatura relacionados ao uso de polifenóis e sua associação com os efeitos sobre o desenvolvimento da atividade locomotora de mamíferos.

O presente trabalho se somará aos já existentes, os quais apresentaram resultados promissores acerca da relação desses compostos com a saúde do organismo, apresentando efeitos sobre as atividades inflamatória e imunológica. A partir disso, surge o questionamento em relação a que outros benefícios esses fármacos podem trazer.

3 REVISAO DA LITERATURA

3.1 DESENVOLVIMENTO MOTOR

O desenvolvimento e a maturação do organismo dos mamíferos continuam logo após o nascimento, sofrendo uma maior influência de fatores ambientais. Determinados períodos desse processo são mais sensíveis a essas influências, positiva ou negativamente, e são conhecidos como períodos críticos (PCs) (LOPES; MAIA, 2000). Estes, representam, portanto, momentos de maior prontidão e elevada sensibilidade aos estímulos de treino e instrução, por exemplo (LOPES; MAIA, 2000). O período da lactação, que compreende os 21 dias pós natal nos ratos e, pelo menos, 180 dias nos humanos, é considerado crítico para o desenvolvimento, sendo responsável por grandes alterações fisiológicas e funcionais, necessárias ao processo adaptativo do recém-nascido (OŠTÁDALOVÁ; BABICKÝ, 2012).

Anteriormente, acreditava-se que os PCs influenciavam somente o desenvolvimento do sistema nervoso central (DOBBING, 1995); porém, hoje, sabe-se que estes períodos são capazes de provocar modificações em outros sistemas, incluindo o motor. A evolução da locomoção depende da interação entre o sistema musculoesquelético, o ambiente e o sistema nervoso, sendo este um processo contínuo e ordenado (DICKSON et al., 2000; CONOLLY, 2000).

O comportamento locomotor é considerado altamente imaturo em mamíferos recém-nascidos, amadurecendo lentamente nas primeiras semanas de vida. Os estágios do desenvolvimento motor parecem seguir um gradiente rostro-caudal de maturação. Ao nascer, o rato encontra-se em decúbito ventral, com a cabeça levantada passivamente pela curvatura do corpo e com seus membros estendidos para longe do eixo do corpo.Durante os primeiros dias de vida, os ratos mostram pouca locomoção para a frente. Estes animais exibem movimentos de rotação e rastreamento, durante os quais os membros posteriores permanecem amplamente passivos (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993). Os animais começam a levantar a cabeça no oitavo dia pós-natal (P8), depois os ombros permanecem elevados na maior parte do tempo, com os membros movendo-se próximo ao eixo do corpo. Esses movimentos são gradualmente substituídos por engatinhar com os quatro membros e, finalmente, por volta do 10° dia pós-natal (P10), andar de quatro com a barriga livre do chão. De P9 a P13, o padrão de movimento é lento e irregular. Depois, em P14, os movimentos das

patas traseiras se tornam mais complexos e, a partir do P15, esse padrão imaturo se torna mais maduro (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993). E os ajustes posturais acontecem, principalmente, durante as primeiras duas semanas; passados esses estágios, movimentos dinâmicos podem ser realizados e isso corresponde à manutenção completa dos receptores sensoriais. Sendo assim, pode-se sugerir que a locomoção se torna eficiente quando os animais abrem os olhos (LELARD *et al.*, 2006).

A atividade locomotora tem sido amplamente analisada em estudos envolvendo efeitos e/ou funções de drogas, genes e modelos de doenças. A título de exemplo, Lee Stubbeman *et al.* (2017) observaram que o uso da risperidona no início da vida aumentou a atividade locomotora espontânea e a hiperatividade induzida por anfetaminas durante a idade adulta. Uma das ferramentas mais utilizadas para a observação da locomoção é o teste de campo aberto.

O teste de campo aberto, desenvolvido na década de 1930, é utilizado para avaliação de vários parâmetros, entre eles o comportamento ansioso (ver uso do termo) e o desenvolvimento motor de animais não humanos (MONTE, 2011). O campo é divido em três áreas, numeradas de 1 a 3, do centro para a extremidade, essa divisão possibilita a análise de comportamentos naturais dos animais, como a preferência pelas extremidades e a exploração do ambiente, auxiliando na avaliação comportamental do desenvolvimento da atividade locomotora, considerando quanto tempo o animal permanece em um determinado ponto (MONTE, 2011). Desse modo, pode-se utilizar tal ferramenta para apurar a influência externa, especialmente da nutrição, sob as modificações no comportamento locomotor dos animais (BARROS et al., 2006; ARAGÃO et al., 2011). Os dias escolhidos neste estudo para a aplicação do teste condizem com períodos críticos de desenvolvimento motor (BURBANO, 2017).

3.2 POLIFENÓIS

Os polifenóis são compostos orgânicos caracterizados pela presença de múltiplas unidades estruturais de fenol, encontrados em diversos alimentos de origem vegetal (SCALBERT; JOHNSON; SALTMARSH, 2005). Dependendo da estrutura química, os polifenóis podem ser divididos em: estilbenos, ácidos fenólicos, lingnanas e flavonoides (MANACH et al., 2004). Recentemente, o uso de polifenóis tem despertado o interesse de muitos pesquisadores, devido, principalmente, às suas ações anti-inflamatória e

antioxidante (BARET et al., 2013; STEVANOVIC; DIOUF; GARCIA-PEREZ, 2009; GOMEZ-PINILLA; NGUYEN, 2012).

A inclusão de alimentos fonte de polifenóis pode auxiliar na prevenção de algumas doenças crônicas através das suas ações sobre a atividade enzimática, a proliferação e diferenciação celular, bem como seu efeito sobre as vias de resposta inflamatória (ALAM *et al.*, 2020; LUCA *et al.*, 2019). Os polifenóis podem influenciar, por exemplo, na glicemia, atuando na inibição da absorção de glicose e na resistência à insulina (GUASCH-FERRÉ *et al.*, 2017). Outro importante achado, refere-se a capacidade do kaempferol de causar efeitos benéficos sobre a formação óssea, podendo auxiliar na prevenção e no tratamento da osteoporose (WONG; CHIN; IMA-NIRWANA, 2019).

3.2.1 Kaempferol

O kaempferol (3,5,7-trihydroxy-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopyran-4-one) representa um dos polifenóis mais abundantes da classe dos flavonoides, está presente em vários vegetais e frutas. Este polifenol, bem como seus derivados, tem apresentado efeitos cardioprotetores, anti-inflamatórios e antidiabéticos, por exemplo, tornando-se objeto de estudo de muitos pesquisadores (IMRAN, M. *et al.*, 2019) (WANG, T.; WU, Q.; ZHAO, T., 2020).

Os vegetais verdes, como espinafre, couve e cebolinha, são as principais fontes de kaempferol. Não existem recomendações dietéticas para a ingestão de flavonoides e seu consumo varia entre as populações, considerando diferenças geográficas, culturais e socioeconômicas (DABEEK; MARRA, 2019). A tabela 1 apresenta as quantidades de kaempferol em miligramas a cada 100 gramas do alimento.

Tabela 1 – Quantidade de Kaempferol (mg) em 100g de alimento

Alimento	**Quantidade de Kaempferol (mg/100g)**
Espinafre	55,0 mg
Couve	47,0 mg
Couve-chinesa	22,5 mg
Cebolinha	12,5 mg
Brócolis	7,2 mg
Erva-doce	6,5 mg
Cereja	5,14 mg

Fonte: Dabeek; Marra, (2019)

Assim como os outros nutrientes, para que os polifenóis apresentem efeitos no metabolismo humano é necessário que estes estejam biodisponíveis para serem metabolizados e incorporados aos tecidos. Com relação ao kaempferol, estudos acerca da sua farmacocinética revelaram uma alta polaridade e, consequentemente, uma baixa absorção pelo organismo (IMRAN, M. *et al.*, 2019). Com o intuito de aumentar a biodisponibilidade do kaempferol, experimentos envolvendo a adição de outros compostos, como a quercetina (falar mais dela), na sua administração apresentaram resultados positivos, melhorando a bioeficácia desse composto (IMRAN, M. *et al.*, 2019).

3.2.2 Resveratrol

Um polifenol do tipo estilbeno bastante utilizado em estudos é o resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), sendo este um composto encontrado abundantemente em mais de 70 espécies de plantas, incluindo amoras, amendoim e uvas, e que possui a capacidade de melhorar a função celular e, consequentemente, a saúde do organismo (BAUR et al., 2006) (MENG *et al.*, 2021). A quantidade de resveratrol presente em alguns alimentos está representada na tabela 2.

Tabela 2 – Quantidade de resveratrol (mg) em 100g de alimento

Alimento	Quantidade de resveratrol em 100g
Amoras	5 mg
Uvas frescas	0,24 a 1,25 mg
Amendoim	1,12 mg
Suco de uva vermelha	0,50 mg
Mirtilo	0,38 mg
Pistache	0,11 mg

Fonte: Meng *et al.*, (2021)

O efeito anti-inflamatório do resveratrol, estudado tanto in vitro quanto in vivo, já está bem esclarecido na literatura (MENG *et al.*, 2021). Simão *et al.*, (2012) observaram que o tratamento prévio de 7 dias com 30 mg/kg de resveratrol foi capaz de suprimir parte da resposta inflamatória do hipocampo após uma isquemia cerebral global provocada em ratos. Corroborando, o resveratrol também suprimiu a neuroinflamação mediada por micróglia e protegeu os neurônios contra danos inflamatórios, podendo o seu uso ser considerado como uma boa estratégia nutricional para auxiliar na prevenção de doenças neuroinflamatórias (HOU *et al.*, 2019).

De maneira semelhante ao kaempferol, o resveratrol também apresenta baixa biodisponibilidade, sendo rapidamente absorvido pelos enterócitos, porém com

pequenas quantidades atingindo a corrente sanguínea; necessitando, assim, do uso de metodologias específicas para aumentar sua eficácia, nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) e portadores de lipídios nanoestruturados (NLCs) são alguns exemplos (MENG *et al.*, 2021). Além do uso dessas metodologias, estudos recentes revelam que o etanol é capaz de melhorar a biodisponibilidade do resveratrol (MUCACA *et al.*, 2022).

3.3 POLIFENÓIS E DESENVOLVIMENTO MOTOR

A relação entre a aplicação de polifenóis e os efeitos no desenvolvimento motor ainda não está bem esclarecida. Supõe-se que, por possuir propriedades anti-inflamatória, antioxidante e outras mencionadas anteriormente, essas substâncias poderiam interferir positivamente no desenvolvimento e manutenção das capacidades motoras.

Baur et al. (2006) analisaram camundongos que consumiam uma dieta hipercalórica juntamente com o resveratrol e puderam constatar que eles melhoraram constantemente suas habilidades motoras à medida que envelheciam, a ponto de se tornarem indistinguíveis do grupo controle alimentado com dieta padrão. A partir deste e de outros estudos (CAI *et al.*, 2018; GERHARDT *et al.*, 2011; ZHANG, L. F. *et al.*, 2018), foi possível sugerir que o resveratrol e outras moléculas com propriedades semelhantes podem ser ferramentas valiosas na busca por reguladores-chave do balanço energético, saúde e longevidade.

Em se tratando do uso de kaempferol, Wong et al. (2019) verificaram que a aplicação deste polifenol durante 12 dias em ratos Sprague-Dawley recém-nascidos, melhorou a calcificação em áreas de neoformação óssea, contribuindo para um desenvolvimento motor adequado. Além disso, Visco (2022) identificou uma melhora considerável da atividade locomotora de ratos submetidos à paralisia cerebral.

Apesar desses achados, estudos sobre a relação entre o kaempferol e o desenvolvimento da atividade locomotora ainda são escassos, impossibilitando o estabelecimento de todos os reais benefícios desse composto, bem como as doses dietéticas adequadas, e enfatizando a necessidade de experimentos mais aprofundados, tanto *in vivo* quanto *in vitro.*

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do tratamento neonatal com polifenóis sobre o desenvolvimento motor de ratos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aferir o peso corporal dos filhotes durante a lactação;
- Analisar a atividade locomotora dos animais.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Questões éticas

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), baixo o n° de processo 0052/2019 (ANEXO 1). A manipulação e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

5.2 Animais

Para o acasalamento foram utilizadas 16 ratas albinas da linhagem *Wistar* e 8 ratos machos adultos (acrescentar as femeas), provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Para escolha das ratas foram utilizados alguns critérios: 1) não possuir parentesco, 2) idade entre 90 e 120 dias de vida, 3) peso entre 220 e 250 gramas e 4) ser nulíparas. Estes cuidados foram adotados para minimizar possíveis influências genéticas e fisiológicas nos resultados.

Os animais foram mantidos em biotério de experimentação, com temperatura de 23°C±2°C, num ciclo 12/12h [ciclo claro (20:00 às 08:00 h) e ciclo escuro (08:00 às 20:00 h)] e livre acesso à água filtrada e alimentação. Após o período de adaptação, os roedores foram colocados em gaiolas padrão de biotério feita de polipropileno (33x40x17cm) para mapeamento do ciclo estral através de esfregaço vaginal, e no período estro as fêmeas foram postas para acasalar (2 fêmeas /1 macho). Após visualização da presença de espermatozoide na cavidade vaginal (MARCONDES, BIANCHI e TANNO, 2002), as ratas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas, onde possuíram livre acesso a água filtrada e a dieta padrão de biotério (Presence®, Brasil).

Um dia após o nascimento, os filhotes foram separados das respectivas mães para serem pesados e selecionados. A ninhada foi ajustada para oito filhotes (com o máximo de filhotes machos possíveis, sendo utilizadas as fêmeas apenas para completar a ninhada). No 1º dia pós-natal, foram escolhidos os machos com peso entre 5,5 e 8,5 g. Os animais supranumerários foram sacrificados por decapitação. Os animais foram amamentados durante os primeiros 21 dias pós-natal (período de aleitamento), nesse período (1° ao 21° dia pós-natal) os filhotes foram submetidos ao tratamento com kaempferol e resveratrol por via intraperitoneal. No 21° dia pós-natal, foi realizado o

desmame dos filhotes. Após o desmame, os animais foram alimentados com dieta padrão de biotério (Presence®, Brasil) até os 70 dias de idade.

5.3 Desenho experimental

Os animais foram divididos em três grupos de acordo com os polifenóis e o veículo, o dimetilsulfóxido (DMSO), utilizado, também, para dissolver os polifenóis, que foram aplicados nos filhotes durante o período de lactação, formando os seguintes grupos: Grupo Controle - Veículo DMSO (GD, n=16). Grupo Kaempferol (GK, n=16), Grupo Resveratrol (GR, n=16). As dietas padrão (Comercial, Presence) foram sempre ofertadas *ad libitum*.

5.4 Utilização dos polifenóis

Durante a lactação, os grupos experimentais receberam kaempferol (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) e resveratrol (Roval, Brasil), ambos na dose de 1 mg/kg de peso corporal por via intraperitoneal (i.p)., (XIAO et al., 2012; LARROSA et al., 2009). O grupo controle recebeu o veículo dimetilsulfóxido (DMSO) i.p. O kaempferol e o resveratrol foram obtidos no formato de cristais sólidos, posteriormente dissolvidos em solução obtida pela mistura (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) e salina (NaCl), com uma concentração final de 1% DMSO. Foi utilizado um volume de 100µl/10g de peso corporal do animal. As administrações ocorreram nos filhotes do 1° ao 21° dia de vida. Diariamente, os filhotes tiveram seus pesos aferidos individualmente para que fosse possível calcular o volume das doses, as mesmas foram aplicadas utilizando seringas descartáveis para insulina, próprias para cada animal.

5.5 Avaliação do peso corporal

O peso corporal foi avaliado nos filhotes diariamente do 1° ao 21° dia pós-natal, segundo o protocolo de Silva et al. (2005). Foi utilizada uma balança eletrônica (Shimadzu, modelo BL3200H com sensibilidade de 0,01 g), no horário de 08:00 às 10:00 horas

5.6 Atividade locomotora

Foi avaliada aos 8°, 14°, 17° e 21° dias pós-natal, através de um sistema de monitoramento de pequenos animais durante a fase escura do ciclo circadiano (10:00h as 12:00h). Essas idades foram escolhidas por apresentarem marcos do desenvolvimento da locomoção nos animais (WESTERGA e GRAMSBERGEN, 1990). O sistema

consiste em um campo aberto circular (Ø1m), delimitado por paredes de 30 cm de altura. A trajetória do animal foi registrada por uma câmera digital, durante cinco minutos, enquanto o animal se locomovia livremente pelo campo. Na troca dos animais, o campo era limpo com solução de água e hipoclorito, e o etil vinil acetato (EVA) trocado, para eliminar odores que pudessem interferir no comportamento do animal seguinte. Os vídeos foram analisados *off-line*, através do sistema automático de análise ANY-maze, do qual foram extraídos os seguintes dados:

Distância percorrida (m): Soma de todo o percurso realizado pelo animal que foi capaz de deslocar o seu centro de massa ao longo do comprimento do seu raio.

Velocidade média (m/s): Taxa do deslocamento total pelo tempo que o animal permaneceu em movimento.

Gasto energético total (kj): É o gasto energético total durante o período de deslocamento.

Tempo de imobilidade (s): Tempo total que o animal permaneceu parado no campo aberto.

Número de paradas: Número total de paradas realizadas no campo.

Tempo de permanência nas áreas do campo: O campo aberto foi dividido virtualmente em três áreas (central, intermediária e periférica). Sendo dado o tempo total dos animais nestas áreas.

Com esse conjunto de informações podemos inferir sobre o comportamento locomotor desses animais.

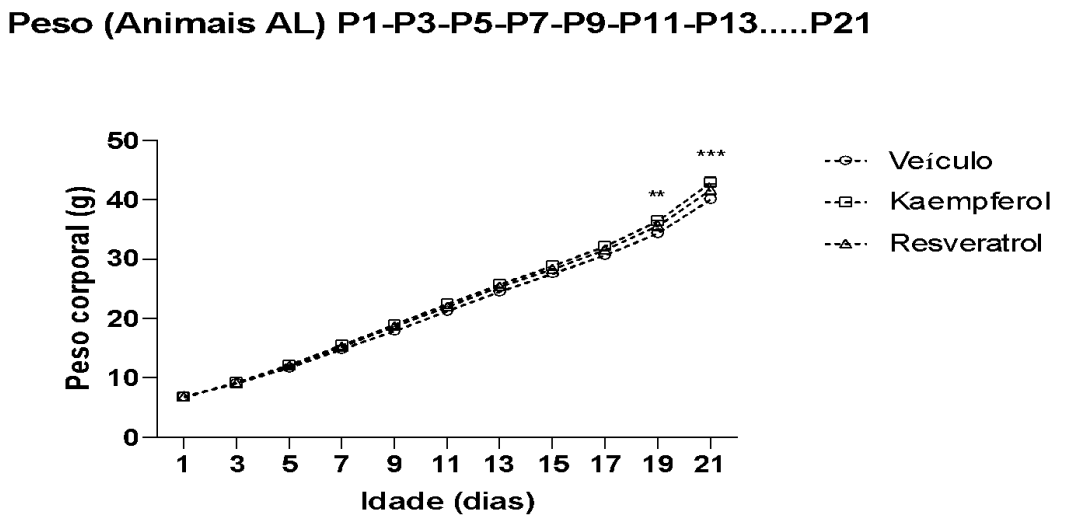
5.7 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente através do software GraphPad Prism 6® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Inicialmente, foi realizado o teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Para as variáveis que passaram no teste de normalidade, foram utilizados testes paramétricos ANOVA correspondentes (one ou two-way com ou sem medidas repetidas) com pós-teste de Tukey. Foi considerado significante o valor de $p<0,05$.

6 RESULTADOS

Com relação ao peso corporal dos animais no período de lactação, pôde-se observar que a partir do 19° dia pós-natal, o grupo kaempferol apresentou maior peso em relação ao grupo veículo (DPN19: Veículo = 34,43 ± 0,62; Kaempferol = 36,46 ± 0,70; em gramas, $p<0,01$; DPN21: Veículo = 40,17 ± 0,77; Kaempferol = 42,99 ± 0,86; em gramas, $p<0,01$) (Figura 1).

Figura 1 – Peso corporal de ratos machos durante o período de lactação.



Peso corporal de ratos machos durante o período de lactação. Grupos: Veículo dimetilsulfóxido, (n=16); Kaempferol, (n=16); Resveratrol, (n=16). Valores expressos em média ± EPM. Teste *two way* ANOVA, seguido do pós-teste Tukey; ***P*<0,01; ****P*<0,001; Kaempferol *vs.* Veículo.

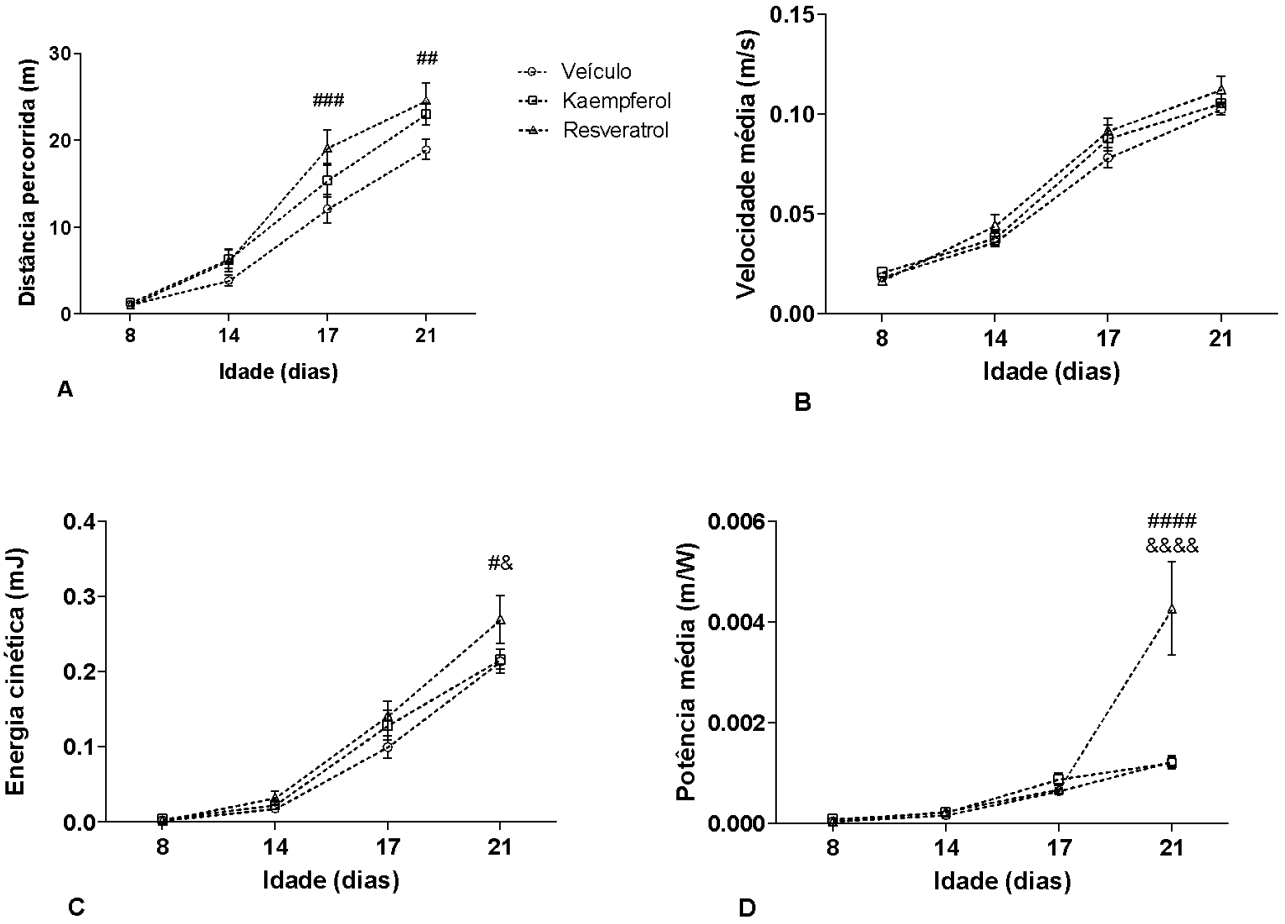
A partir da observação dos dados resultantes da análise da atividade locomotora dos animais, constatou-se que a distância percorrida pelos animais do grupo resveratrol, nos dias 17 e 21 ($p<0,001$ e $p<0,01$, respectivamente), foi maior em relação ao grupo controle. (Figura 2A)

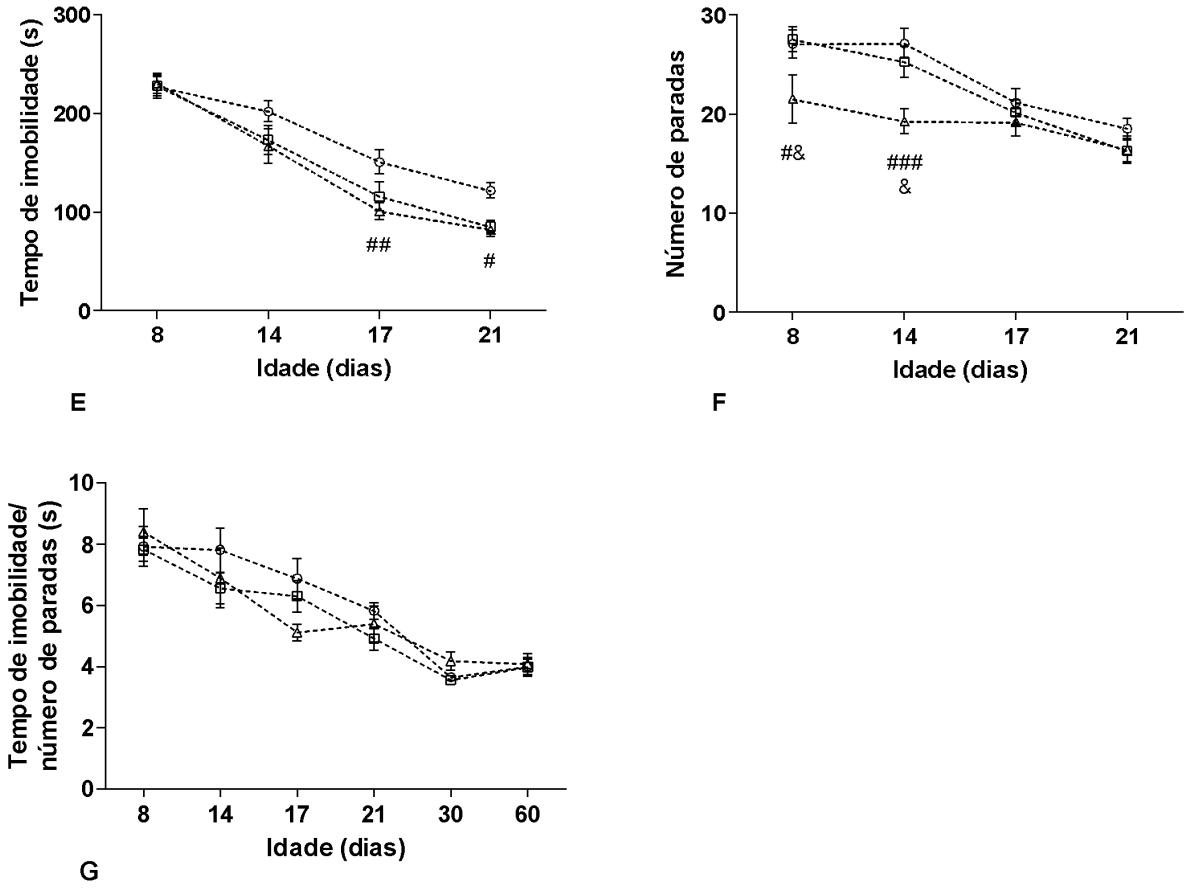
Não houve alteração significativa na velocidade média entre os grupos experimentais e controle (Figura 2B). Relativo ao tempo de imobilidade, o grupo kaempferol apresentou menor tempo em relação ao grupo veículo nos dias 17 e 21 ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente) (Figura 2E).

Relativo ao número de paradas, os animais do grupo resveratrol apresentaram um menor número de paradas em relação ao grupo controle e kaempferol nos dias 8 ($p<0,05$, para ambos) e 14 ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente) (Figura 2F). Na análise da relação entre o tempo de imobilidade e o número de paradas, foi possível constatar que não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 2G).

A energia cinética e a potência média foram maiores no grupo resveratrol em relação tanto ao grupo controle (DPN21 $p<0,05$ e $p<0,0001$, respectivamente) quanto em relação ao grupo kaempferol (DPN21 $p<0,05$ e $p<0,0001$, respecticamente) (Figura 2C e 2D)

Figura 2 – Efeitos da aplicação de polifenóis sobre os parâmetros da atividade locomotora.

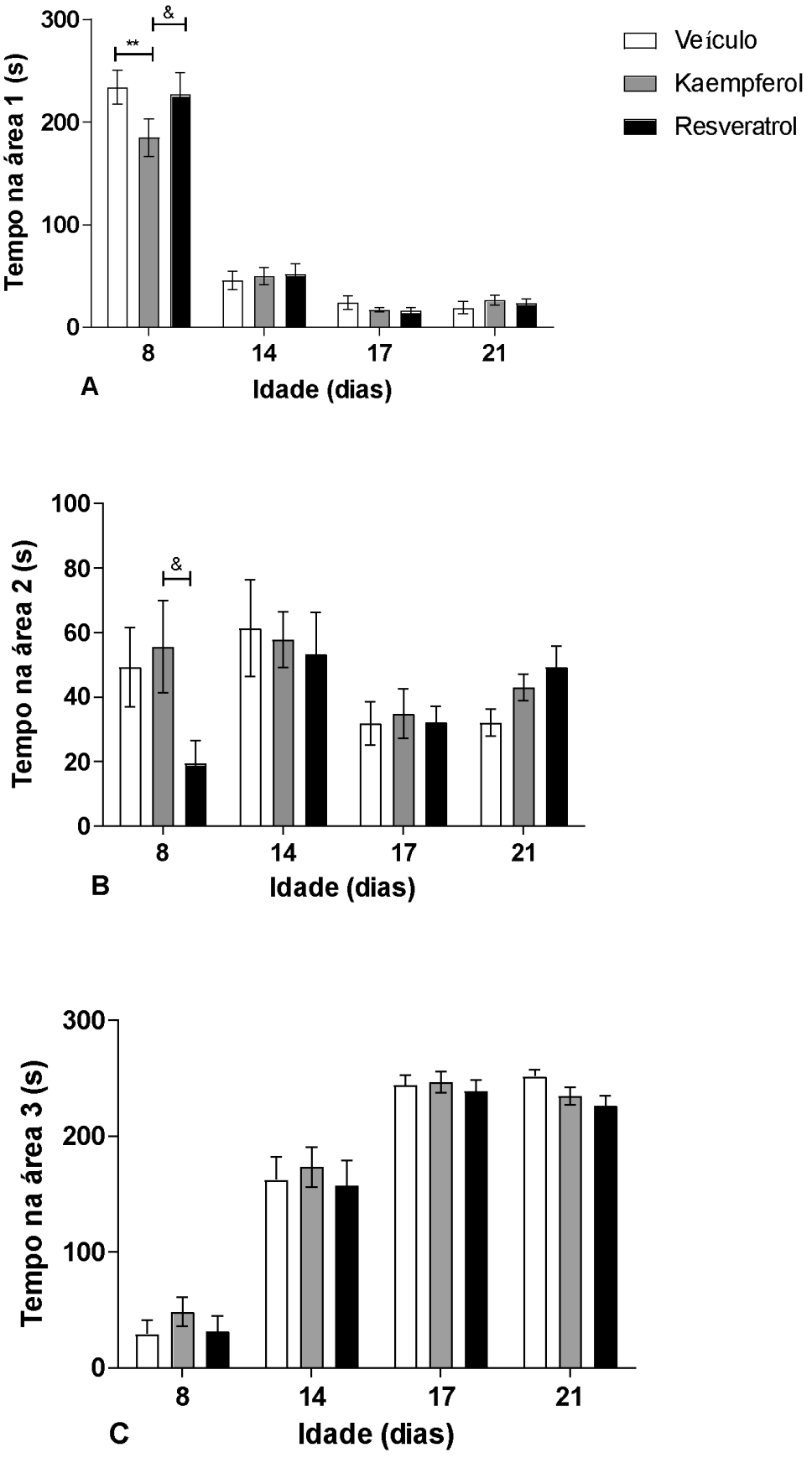




A prole de ratos no 8º, 14º, 17º e 21º dia pós-natal foram avaliados em campo aberto durante 5 minutos. Distância percorrida (a), velocidade média (b), energia cinética (c), potência média (d), tempo de imobilidade (e), número de paradas (f), relação tempo de imobilidade/número de paradas (g). Grupos: Veículo (DMSO) (n=16); Kaempferol (n=16); Resveratrol (n=16). Valores expressos em média ± EPM. Teste two way ANOVA, seguido do pós-teste Tukey.
$^{\#}P<0,05$; $^{\#\#}P<0,01$; $^{\#\#\#}P<0,001$; $^{\#\#\#\#}P<0,0001$ Resveratrol *vs.* Veículo.
$^{\&}P<0,05$; $^{\&\&\&\&}P<0,0001$ Resveratrol *vs.* Kaempferol.

Na análise do tempo de permanência em cada área do campo, não foram encontradas diferenças significativas entres os grupos na região periférica (área 3). Já na área central (área 1), no DPN8, tanto o grupo controle quanto o resveratrol permaneceram maior tempo em relação ao grupo kaempferol ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente). Na área intermediária (área 2), o grupo kaempferol, também no DPN8, permaneceu por mais tempo em relação ao grupo resveratrol ($p<0,01$) (Figura 3) – colocar no gráfico as áreas.

Figura 3 – Efeitos da aplicação de polifenóis sobre o tempo de permanência em cada área do campo aberto locomotora


Veículo
Kaempferol
Resveratrol
Tempo na área 1 (s)
300
200
100
0
**
&
8
14
17
21
A
Idade (dias)
Tempo na área 2 (s)
100
80
60
40
20
0
&
8
14
17
21
B
Idade (dias)
Tempo na área 3 (s)
300
200
100
0
8
14
17
21
C
Idade (dias)

A prole de ratos no 8º, 14º, 17º e 21º dia pós-natal foram avaliados em campo aberto durante 5 minutos. Tempo de permanência na área central (a), tempo de permanência na área intermediaria (b) tempo de permanência na área periférica (c). Grupos: Veículo (n=16); Kaempferol (n=16); Resveratrol (n=16). Valores expressos em média ± EPM. Teste two way ANOVA, seguido do pós-teste Tukey. **P<0,01 Kaempferol *vs.* Veículo.
[&]P<0,05 Resveratrol *vs*. Kaempferol.

7 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do tratamento neonatal com polifenóis sobre o desenvolvimento motor de ratos. Dessa forma, os resultados apresentados demonstraram que o resveratrol influenciou no desenvolvimento motor dos animais de forma mais significativa do que o kaempferol. O grupo tratado com resveratrol se mostrou mais ativo, principalmente durante os dias 17 e 21, idades relacionadas a uma maior ativação das musculaturas do tronco e de membros inferiores, tornando, portanto, a locomoção mais eficiente (BURBANO, 2017)

Em estudos desenvolvidos anteriormente, foi possível identificar os efeitos relacionados ao uso dos polifenóis kaempferol e resveratrol, sendo estes capazes, por exemplo, de auxiliar no tratamento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (WANG, T.; WU, Q.; ZHAO, T., 2020; YANG, Yan *et al.*, 2022). A ação do kaempferol sobre a redução da adipogênese e aumento da lipólise pôde ser observada por Torres-Villarreal et al. (2019) ao utilizar 60μM de kaempferol em uma cultura de células 3T3-L1. Porém, estudos utilizando concentrações menores não apresentaram diferença significativa sobre a redução da quantidade de gordura (TORRES-VILLARREAL *et al.*, 2019). Analisando os resultados aqui apresentados, observou-se um aumento no peso corporal dos animais do grupo kaempferol em relação ao grupo controle, entretanto, como não era objetivo do estudo avaliar o percentual de gordura corporal, não podemos afirmar que esse aumento de peso está relacionado com aumento de gordura. Em seu trabalho, Chaves *et al.* (2020) observaram que o kaempferol aumentou o peso corporal dos animais alimentados com uma dieta hiperlipídica, mas, ao analisarem o peso do tecido adiposo desse grupo, constataram que este não foi maior do que nos outros grupos, podendo o peso corporal estar relacionado com aumento da densidade óssea e muscular, já que os flavonoides favorecem o aumento do hormônio do crescimento (GH) e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (CHAVES *et al.*, 2020).

Além da dificuldade de estabelecer a quantidade necessária para causar alterações na composição corporal de modelos animais, um outro fator que limita o uso

do kaempferol é a sua rápida metabolização e excreção, apresentando baixa disponibilidade, e, consequentemente, não atingindo o efeito máximo esperado (LEE, Y. J. *et al.*, 2015; YANG, Yan *et al.*, 2022). Alguns métodos utilizados para aumentar a biodisponibilidade requerem o uso de substâncias que possuem maior afinidade com receptores de superfície da membrana celular, para que as moléculas de kaempferol sejam transportadas junto a elas. Porém, são métodos caros e mais trabalhosos (YANG, Yan *et al.*, 2022). Por isso, no nosso estudo optamos pela via intraperitoneal. Essa via de administração foi escolhida para aumentar a biodisponibilidade do composto, que é marginal quando administrado por via oral

No presente trabalho, a distância percorrida pelos animais, a energia cinética, a potência média e o número de paradas foram maiores no grupo que recebeu o resveratrol, sendo estes dados complementares, afinal, se o animal se movimenta mais, consequentemente gasta mais energia e permanece menos tempo parado. Corroborando, Cai *et al.* (2018) identificaram que ratos tratados com resveratrol foram mais ativos e percorreram uma distância maior. Além disso, apesar da preferência natural dos animais pela região mais periférica, os animais dos grupos experimentais passaram maior tempo na região central, sendo considerados, portanto, como mais ativos e menos ansiosos (MONTE, 2011).

A associação do resveratrol com o desenvolvimento da atividade locomotora já é bastante conhecida e estudada, sendo o composto, inclusive, aplicado em modelos de Doença de Parkinson (DP) e outros distúrbios neurológicos. Zhang *et al.* (2018), ao utilizarem o resveratrol para auxiliar no tratamento da perda progressiva de movimentos em camundongos com DP, constataram que o tratamento com o polifenol foi capaz de aliviar déficits motores e cognitivos.

Já em relação ao kaempferol, sua utilização em modelos de análise de desenvolvimento motor é pouco relatada na literatura. Ademais, não foram encontrados estudos que envolvessem o emprego do teste de campo aberto com o intuito de avaliar a aplicação deste polifenol e as suas repercussões na atividade locomotora.

Durante o presente estudo, a aplicação de kaempferol não demonstrou exercer influência sobre a atividade locomotora dos ratos. Tal fato pode estar relacionado, como já mencionado anteriormente, com a falta de conhecimento sobre a dose dietética adequada. Apesar disso, alguns poucos estudos foram capazes de demonstrar uma

relação entre este polifenol e o sistema locomotor. Recentemente, Visco (2022) analisou os efeitos da aplicação do kaempferol sobre o desenvolvimento motor de ratos submetidos à Paralisia Cerebral, e os resultados obtidos apontaram para uma associação positiva entre a aplicação neonatal de kaempferol e a redução de déficits motores nos animais.

Uma das limitações deste estudo foi a utilização de um único teste para avaliação do desenvolvimento da atividade motora, bem como a falta de análises bioquímicas e histoquímicas para verificar alterações musculares e sobre a composição corporal. A partir desses achados, fica evidente a necessidade de novos estudos, tanto para reafirmar a influência do resveratrol quanto para investigar, de forma mais aprofundada, a influência do kaempferol.

8 CONCLUSÃO

Durante o período avaliado, o resveratrol foi capaz de influenciar positivamente no desenvolvimento motor dos animais, fazendo com que estes percorressem uma maior distância, com consequente aumento do comportamento exploratório. Neste estudo, o uso do kaempferol não apresentou efeitos sobre o desenvolvimento motor, mas aumentou o peso dos animais, não sendo possível afirmar se o kaempferol aumentou a lipogênese, carecendo de mais estudos.

De forma geral, o presente trabalho é relevante por apresentar novos dados e levantar outros questionamentos acerca dos polifenóis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, W. *et al.* Kaempferol as a Dietary Anti-Inflammatory Agent: Current Therapeutic Standing. **Molecules**, 1 set. 2020. v. 25, n. 18. Disponível em: </pmc/articles/PMC7570692/>. Acesso em: 17 out. 2022.

ARAGÃO, R. S. et al. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents – A reproductibility study. J. neurosci. Methods., Recife, PE, v. 195, n.2, p. 216-221, 2011;

BÂ, A.; SERI, B. V. Psychomotor functions in developing rats: Ontogenetic approach to structure-function relationships. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 1995. v. 19, n. 3, p. 413–425.

BARROS et al. A regional model (Northeast Brazil) of induced kmal-nutrition delays of reflexes and locomotor activity in rats. Nutr. neurosci., v. 9, p. 99-104, 2006.

BAUR, J., PEARSON, K., PRICE, N. *et al.* Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444, 337–342 (2006). https://doi.org/10.1038/nature05354

BURBANO, E. V. C. Dietas hiperlipídicas materna: repercussões sobre a ontogenia de reflexos e da atividade locomotora da prole de ratos. 24 fev. 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/25008>. Acesso em: 7 out. 2022.

CAI, J. C. *et al.* Resveratrol attenuates neurological deficit and neuroinflammation following intracerebral hemorrhage. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 1 maio. 2018. v. 15, n. 5, p. 4131. Disponível em: </pmc/articles/PMC5920231/>. Acesso em: 1º out. 2022.

CHAVES, W. F. *et al.* Neonatal administration of kaempferol does not alter satiety but increases somatic growth and reduces adiposity in offspring of high-fat diet dams. **Life Sciences**, 15 out. 2020. v. 259, p. 118224.

DABEEK, W. M.; MARRA, M. V. Dietary Quercetin and Kaempferol: Bioavailability and Potential Cardiovascular-Related Bioactivity in Humans. 2019. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/nutrients>.

DA-SILVA, W. S. et al. The small polyphenolic molecule kaempferol increases cellular energy expenditure and thyroid hormone activation. Diabetes, v. 56, n. 3, p. 767-776, Mar 2007.

GABRIEL OLIVEIRA DO MONTE, B. **QTLs Associados com Emocionalidade em Fêmeas Pós-Parto de Camundogos LG/J x SM/J**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2011.

GERHARDT, E. *et al.* Idebenone and Resveratrol Extend Lifespan and Improve Motor Function of HtrA2 Knockout Mice. **PLoS ONE**, 19 dez. 2011. v. 6, n. 12, p. 28855. Disponível em: </pmc/articles/PMC3242749/>. Acesso em: 16 out. 2022.

GOMEZ-PINILLA, F.; NGUYEN, T. T. J. Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. Nutritional Neuroscience, v. 15, n. 3, p. 127–133, 19 maio 2012.

GUASCH-FERRÉ, M. *et al.* Dietary Polyphenols, Mediterranean Diet, Prediabetes, and Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2017. v. 2017. Disponível em: </pmc/articles/PMC5572601/>. Acesso em: 17 out. 2022.

HENSCH, T.K. Critical period plasticity in local cortical circuits. Nature Reviews Neuroscience. V.6, p.787-888, 2005.

HOU, Y. *et al.* A Novel Quinolyl-Substituted Analogue of Resveratrol Inhibits LPS-Induced Inflammatory Responses in Microglial Cells by Blocking the NF-κB/MAPK Signaling Pathways. **Molecular nutrition & food research**, 1 out. 2019. v. 63, n. 20. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31378007/>. Acesso em: 15 out. 2022.

IMRAN M, SALEHI B, SHARIFI-RAD J, et al. Kaempferol: A Key Emphasis to Its Anticancer Potential. *Molecules*. 2019;24(12):2277. Published 2019 Jun 19. doi:10.3390/molecules24122277

LARROSA, M. et al. Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbiota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. *J Agric Food Chem*, v. 57, n. 6, p. 2211–2220, 2009.

LEE STUBBEMAN, B. *et al.* Early-life risperidone enhances locomotor responses to amphetamine during adulthood. **European Journal of Pharmacology**, 5 out. 2017. v. 812, p. 256–263.

LEE, Y. J. *et al.* Kaempferol suppresses lipid accumulation by inhibiting early adipogenesis in 3T3-L1 cells and zebrafish. **Food & Function**, 5 ago. 2015. v. 6, n. 8, p. 2824–2833. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/fo/c5fo00481k>. Acesso em: 1º out. 2022.

LELARD, T. *et al.* Postural development in rats. **Experimental Neurology**, 1 nov. 2006. v. 202, n. 1, p. 112–124.
LUCA, S. V. *et al.* Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. **https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546669**, 21 fev. 2019. v. 60, n. 4, p. 626–659. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2018.1546669>. Acesso em: 17 out. 2022.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Braz J Biol, v. 62, n. 4A, p. 609-614, Nov 2002.

MEEUSEN, R. Exercise, Nutrition and the Brain. [s.d.].

MENG, T. *et al.* Anti-Inflammatory Action and Mechanisms of Resveratrol. **Molecules**, 1 jan. 2021. v. 26, n. 1. Disponível em: </pmc/articles/PMC7796143/>. Acesso em: 15 out. 2022.

MUCACA, C. et al. Antioxidant, hypolipidemic and hypoglycemic effect of red wine in wistar rats fed with obesogenic diet. Food Bioscience, 1 jun. 2022. v. 47, p. 101671.

NEUHOUSER M.L. Dietary flavonoids and cancer risk: Evidence from human population studies. *Nutr. Cancer.* 2004;50:1–7. doi: 10.1207/s15327914nc5001_1.

OŠTÁDALOVÁ, I.; BABICKÝ, A. Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. **Physiological research**, 2012. v. 61, n. Suppl 1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22827866/>. Acesso em: 7 out. 2022.

PATEL MS, SRINIVASAN M: Metabolic progamming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. J Nutr 140: 658-661, 2010.

PEI J., CHEN A., ZHAO L., CAO F., DING G., XIAO W. One-Pot Synthesis of Hyperoside by a Three-Enzyme Cascade Using a UDP-Galactose Regeneration System. *J. Agric. Food. Chem.* 2017;65:6042–6048. doi: 10.1021/acs.jafc.7b02320.

SCALBERT, A.; JOHNSON, I. T.; SALTMARSH, M. Polyphenols: antioxidants and beyond 1-3. [S.l.]: [s.n.], 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcn/article/81/1/215S/4607494>.

SILVA, H. J. et al. Protocol of mensuration to avaliation of indicators of somatic development of wistar rats. Int. J. Morphol., v. 23, n. 3, p. 227-230, 2005.

SIMÃO, F. *et al.* Resveratrol preconditioning modulates inflammatory response in the rat hippocampus following global cerebral ischemia. **Neurochemistry international**, out. 2012. v. 61, n. 5, p. 659–665. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22709670/>. Acesso em: 15 out. 2022.

SÖNMEZ, Ü. *et al.* Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats. Neuroscience Letters, 13 jun. 2007. v. 420, n. 2, p. 133–137.

STEVANOVIC, T.; DIOUF, P. N.; GARCIA-PEREZ, M. E. Bioactive Polyphenols from Healthy Diets and Forest Biomass. p. 264–295, 2009.

TORRES-VILLARREAL, D. *et al.* Anti-obesity effects of kaempferol by inhibiting adipogenesis and increasing lipolysis in 3T3-L1 cells. **Journal of Physiology and Biochemistry**, 15 fev. 2019. v. 75, n. 1, p. 83–88. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13105-018-0659-4>. Acesso em: 1º out. 2022.

VISCO, D. B. Efeitos do tratamento neonatal com kaempferol sobre o desenvolvimento neuro-músculo-esquelético em modelo de paralisia cerebral experimental. 10 jan. 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/43426>. Acesso em: 4 out. 2022.

WANG, T.; WU, Q.; ZHAO, T. Preventive Effects of Kaempferol on High-Fat Diet-Induced Obesity Complications in C57BL/6 Mice. **BioMed Research International**, 2020. v. 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7166264/>. Acesso em: 28 set. 2022.

WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. Development of locomotion in the rat: the significance of early movements. Early Human Development, 1993a. v. 34, n. 1–2, p. 89–100.

WESTERGA, J.; GRAMSBERGEN, A. The development of locomotion in the rat. Brain Res Dev Brain Res, v. 57, n. 2, p. 163-174, Dec 15 1990.

WONG SK, CHIN KY, IMA-NIRWANA S. The Osteoprotective Effects Of Kaempferol: The Evidence From In Vivo And In Vitro Studies. *Drug Des Devel Ther* . 2019; 13: 3497-3514. Publicado em 7 de outubro de 2019 doi: 10.2147 / DDDT.S227738

XIAO, J. et al. Kaempferol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and in vitro. Toxicology, v. 292, n. 1, p. 53-62, Feb 06 2012.

YANG, Yan *et al.* Mechanisms of Kaempferol in the treatment of diabetes: A comprehensive and latest review. **Frontiers in Endocrinology**, 7 set. 2022. v. 13. Disponível em: </pmc/articles/PMC9490412/>. Acesso em: 28 set. 2022.

ZHANG, L. F. *et al.* Resveratrol alleviates motor and cognitive deficits and neuropathology in the A53T α-synuclein mouse model of Parkinson's disease. **Food & function**, 2018. v. 9, n. 12, p. 6414–6426. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30462117/>. Acesso em: 2 out. 2022.

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife – PE – Brasil
Fone: 2126 8543
ceua@ufpe.br

Recife, 28 de agosto de 2019

Ofício nº 48/19

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Raquel da Silva Aragão**
Centro Acadêmico de Vitoria
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **0052/2019**

Certificamos que a proposta intitulada "**Dietas hiperlipídicas hipercalórica maternas com ou sem o uso de kaempferol: Repercussões sobre a flexibilidade metabólica da prol de ratos**". registrado com o nº **0052/2019** sob a responsabilidade de **Prof. Raquel da Silva Aragão** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/08/2019

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Agosto de 2019 a agosto de 2022
Espécie/linhagem/raça	Rato norvegicus wista heterogênico
Nº de animais	264(Adultos= 24 machos e 48 fêmeas; filhotes = 192 machos)
Peso/Idade	Adultos (90a121dias) (filhote do nascimento aos 21 dias)
Sexo	Macho (192) e (24) fêmea
Origem: Biotério de Criação	Bioterio do Departamento de Nutrição da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Bioterio de experimentação no Lab. de estudo em Nutrição e instrumentação Biomédica da (LENIB/UFPE)

Atenciosamente,