



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ERIKA VANESA CADENA BURBANO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO NEONATAL DE KAEMPFEROL OU RESVERATROL  
SOBRE O CRESCIMENTO SOMÁTICO, DESENVOLVIMENTO DA LOCOMOÇÃO,  
COMPORTAMENTO ALIMENTAR, PERFIL BIOQUÍMICO E FLEXIBILIDADE  
METABÓLICA MUSCULAR DE RATOS MACHOS**

RECIFE  
2023

ERIKA VANESA CADENA BURBANO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO NEONATAL DE KAEMPFEROL OU RESVERATROL  
SOBRE O CRESCIMENTO SOMÁTICO, DESENVOLVIMENTO DA LOCOMOÇÃO,  
COMPORTAMENTO ALIMENTAR, PERFIL BIOQUÍMICO E FLEXIBILIDADE  
METABÓLICA MUSCULAR DE RATOS MACHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

**Área de concentração:** Bases Experimentais da Nutrição.

**Linha de pesquisa:** Fisiologia e bioquímica da nutrição, da atividade física e da imunidade.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel da Silva Aragão.

RECIFE  
2023

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

B946e	<p data-bbox="446 1153 1233 1187">Burbano, Erika Vanesa Cadena</p> <p data-bbox="446 1187 1233 1321">Efeitos da administração neonatal de Kaempferol ou Resveratrol sobre o crescimento somático, desenvolvimento da locomoção, comportamento alimentar, perfil bioquímico e flexibilidade metabólica muscular de ratos machos / Erika Vanesa Cadena Burbano. – 2023. 150 p. : il.</p> <p data-bbox="446 1344 1233 1456">Orientadora: Raquel da Silva Aragão. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2023.</p> <p data-bbox="446 1478 1233 1512">Inclui referências e anexo.</p> <p data-bbox="446 1534 1233 1624">1. Atividade locomotora. 2. Comportamento alimentar. 3. Flexibilidade metabólica. 4. Kaempferol. 5. Polifenóis. 6. Resveratrol. I. Aragão, Raquel da Silva (orientadora). II. Título.</p> <p data-bbox="446 1635 1233 1673">612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023 - 223)</p>
-------	---

ERIKA VANESA CADENA BURBANO

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO NEONATAL DE KAEMPFEROL OU RESVERATROL  
SOBRE O CRESCIMENTO SOMÁTICO, DESENVOLVIMENTO DA LOCOMOÇÃO,  
COMPORTAMENTO ALIMENTAR, PERFIL BIOQUÍMICO E FLEXIBILIDADE  
METABÓLICA MUSCULAR DE RATOS MACHOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, na área de concentração Bases Experimentais da Nutrição para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Aprovada em: 24\02\2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Lopes De Souza (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gisélia De Santa Muniz (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tassia Karin Ferreira Borba (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Julliet Araújo De Souza (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Thaynan Raquel Dos Prazeres Oliveira (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE  
2023

## AGRADECIMENTOS

*Inicialmente quero agradecer aquele que me tem fortalecido durante esses anos de doutorado, sem ele não houvesse chegado até aqui. A ti meu **DEUS** todo poderoso, te agradeço e te ofereço cada palavra escrita, cada esforço, cada dia de trabalho.*

*A meu esposo **Fábio** por ser aquele companheiro de lutas, de vida. Obrigada por seu amor, seu tempo e sua proteção.*

*A meu filho **Martín**, que sem lugar a dúvidas é o melhor que me pode ter acontecido durante meu doutorado.*

*A meus pais, **Jorge e Inés**, pais amorosos, exemplo de família, de amor, de responsabilidade e de trabalho árduo.*

*A meus irmãos, **Andrea e Jorge**, pelo amor e pela cumplicidade de sempre.*

*A minhas sobrinhas, **Valentina e Romina**, por sua alegria e carinho.*

*A minha orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dra. Raquel Aragão**, por sua paciência, pelos ensinamentos, por ter sempre aquelas ideias brilhantes que sempre acabam dando certo. Toda minha admiração e respeito para a senhora, que sua caminhada como professora seja longa e prazerosa.*

*Ao **Prof. Dr. Raul Manhães**, muito obrigada professor por ter aberto as portas de seu laboratório a uma Equatoriana desconhecida e pela oportunidade de formar parte de seu grupo de pesquisa. Minha admiração pelo seu trabalho como grande pesquisador.*

*Ao veterinário **Dr. Edeones França**, por me ensinar a cuidar dos ratinhos com cuidado e respeito. Da mesma forma, agradeço ao técnico **Bruno** pelas orientações no manuseio dos animais.*

*À minha querida amiga de pesquisa, **Carol Cadete**, mais conhecida como "**Carolzinha**", muito obrigada pela parceria e pela ajuda com os experimentos. Nunca vou esquecer nossas conversas, nem seu jaleco manchado de violeta.*

*Às minhas queridas amigas do doutorado, **Thaynan Oliveira e Jacqueline Silva**, embora cada uma tenha ficado dentro de sua pesquisa, cada vez que nos víamos tínhamos assunto para conversar e motivos para rir.*

*A todos meus colegas da Unidade de Estudo e Plasticidade Fenotípica, **Wenicios, Débora, Sabrina, Bárbara, Henrique, Carol, Renata, Caio.***

*Aos meus estagiários, **Tháís, Joelma, Carolina e Álvaro**, meninas sem vocês não houvesse conseguido fazer os experimentos. Obrigada pelo tempo, pela disposição de querer aprender e de ajudar. **Álvaro**, muito obrigada por ter me ajudado durante o tempo de pandemia, só nessas horas é que a gente sabe que não estamos sozinhos. Tudo de melhor para vocês meninas. Voem alto.*

*À **Coordenação da Pós-Graduação em Nutrição** e as secretarias **Cecília Arruda** e **Andréa Nascimento** pela disponibilidade e orientação aos mestrandos.*

*A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES**, obrigada por apoiar à pesquisa e colaborar com a formação de novos doutores através da concessão de bolsas de estudo.*

## RESUMO

O desenvolvimento pós-natal, depende de influências ambientais que podem induzir consequências a curto e a longo prazo durante toda a vida, podendo intervir na formação do fenótipo. Certos componentes que formam parte dos alimentos chamados de “compostos bioativos” podem ter efeitos benéficos, inclusive protetores. Dentre esses compostos destacam-se os polifenóis, principalmente o kaempferol e o resveratrol, que possuem propriedades biológicas semelhantes. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração neonatal de kaempferol e resveratrol sobre o crescimento somático, desenvolvimento da locomoção, comportamento alimentar, perfil bioquímico e flexibilidade metabólica muscular de ratos machos. Durante a lactação, ratos machos *Wistar* foram distribuídos em três grupos de acordo com o tratamento farmacológico recebido: Veículo (n=53), Kaempferol (n=55) e Resveratrol (n=50). As administrações ocorreram por via intraperitoneal do 1° ao 21° dia pós-natal (DPN). Os animais foram alimentados com dieta padrão de laboratório (Presence®, Brasil) durante todo o experimento. Durante o período de lactação foram avaliados o peso corporal e o eixo-longitudinal. A partir do desmame (21° DPN), cada grupo farmacológico foi subdividido segundo o status nutricional: alimentado (Veículo<sub>AL</sub>, Kaempferol<sub>AL</sub>, Resveratrol<sub>AL</sub>) e jejum de 24 horas (Veículo<sub>24H</sub>, Kaempferol<sub>24H</sub>, Resveratrol<sub>24H</sub>). O peso corporal e o eixo-longitudinal continuaram sendo avaliados a cada sete dias. O consumo alimentar foi avaliado em dois períodos (24° ao 29° DPN) e (54° ao 59° DPN). No status alimentado, a atividade locomotora, foi avaliada no 8°, 14°, 17°, 21°, 30°, 60° DPN. Assim como, no 30° e 60° DPN no status alimentado e jejum de 24 horas. Consecutivamente foi avaliada a sequência comportamental de saciedade apenas nos animais jejum de 24 horas no 30° e 60° DPN. Aos 62 dias, foi realizado o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (GTTip). Aos 70 dias, após o sacrifício, foram coletados e pesados órgãos e tecidos, avaliado o perfil bioquímico e a expressão de genes relacionados com o metabolismo muscular. No final da lactação, o grupo kaempferol apresentou maior peso corporal. O grupo resveratrol mostrou melhor desempenho locomotor. Ambos os polifenóis apresentaram maior resposta glicêmica no início do GTTip. No 30° DPN, houve a antecipação do ponto de saciedade para ambos

os polifenóis, contudo, apenas o grupo resveratrol teve modificação da microestrutura do comportamento alimentar. Esse efeito não se manteve no 60º DPN. Não houve diferença no consumo alimentar entre os grupos. Animais Veículo<sub>24H</sub> percorreram maior distância em detrimento da potência média. O jejum diminuiu os níveis de glicose, triglicerídeos, colesterol total e o peso relativo do fígado em relação aos animais em status alimentado. O jejum aumentou os níveis de HDL, o peso relativo do encéfalo, do tecido adiposo epididimal, a expressão gênica do *Bhad* e *Pdk4*. Podemos concluir que o uso de polifenóis durante o período crítico do desenvolvimento, em especial o resveratrol, são capazes de influenciar o fenótipo durante seu uso, assim como a mediano prazo (adolescência). As diferenças encontradas entre o kaempferol e o resveratrol podem estar relacionadas com sua estrutura química.

**Palavras-chave:** atividade locomotora; comportamento alimentar; flexibilidade metabólica; kaempferol; polifenóis; resveratrol.

## ABSTRACT

Postnatal development depends on environmental influences that can induce short- and long-term consequences throughout life and may intervene in the formation of the phenotype. Certain components that form part of food called “bioactive compounds” can have beneficial, including protective, effects. Among these compounds, polyphenols stand out, mainly kaempferol and resveratrol, which have similar biological properties. Thus, the present study aimed to evaluate the effects of neonatal administration of kaempferol and resveratrol on somatic growth, locomotion development, feeding behavior, biochemical profile and muscular metabolic flexibility of male rats. During lactation, male Wistar rats were divided into three groups according to the pharmacological treatment received: Vehicle (n=53), Kaempferol (n=55) and Resveratrol (n=50). The administrations took place intraperitoneally from the 1st to the 21st postnatal day (PND). The animals were fed a standard laboratory diet (Presence®, Brazil) throughout the experiment. During the lactation period, body weight and longitudinal axis were evaluated. After weaning (21st PND), each pharmacological group was subdivided according to nutritional status: fed (Vehicle<sub>Fed</sub>, Kaempferol<sub>Fed</sub>, Resveratrol<sub>Fed</sub>) and fasting for 24 hours (Vehicle<sub>Fast</sub>, Kaempferol<sub>Fast</sub>, Resveratrol<sub>Fas</sub>). Body weight and longitudinal axis continued to be evaluated every seven days. Food consumption was evaluated in two periods (24th to 29th PND) and (54th to 59th PND). In the fed status, locomotor activity was evaluated at the 8th, 14th, 17th, 21st, 30th, 60th PND. As well as, in the 30th and 60th PND in fed and 24-hour fasting status. Consecutively, the behavioral sequence of satiety was evaluated only in animals fasting for 24 hours on the 30th and 60th PND. At 62 days, the intraperitoneal glucose tolerance test (GTTip) was performed. At 70 days after sacrifice, organs and tissues were collected and weighed, the biochemical profile and expression of genes related to muscle metabolism were evaluated. At the end of lactation, the kaempferol group had higher body weight. The resveratrol group showed better locomotor performance. Both polyphenols showed a higher glycemic response at the beginning of the GTT<sub>ip</sub>. On the 30th PND, there was an anticipation of the satiety point for both polyphenols, however, only the resveratrol group had a change in the microstructure of eating behavior. This

effect was not maintained in the 60th PND. There was no difference in food consumption between groups. Vehicle<sub>Fast</sub> animals covered a greater distance at the expense of average potency. Fasting decreased the levels of glucose, triglycerides, total cholesterol and the relative weight of the liver in relation to animals in fed status. Fasting increased HDL levels, relative brain weight, epididymal adipose tissue, *Bhad* and *Pdk4* gene expression. We can conclude that the use of polyphenols during the critical period of development, especially resveratrol, are able to influence the phenotype during its use, as well as in the medium term (adolescence). The differences found between kaempferol and resveratrol may be related to their chemical structure.

**Keywords:** locomotor activity; feeding behavior; metabolic flexibility; kaempferol; polyphenols; resveratrol.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão da Literatura

Figura 1 - Neurônios anorexígenos e orexígenos no processo de apetite e saciedade.....	31
Figura 2 - Seleção de combustível pela mitocôndria.....	35
Figura 3 - Mecanismo de oxidação de glicose e ácidos graxos durante o estado alimentado e de jejum.....	36
Figura 4 - Fatores envolvidos nas alterações metabólicas no músculo esquelético durante a privação alimentar.....	39
Figura 5 - Eventos metabólicos que ocorrem no músculo esquelético após a privação alimentar.....	40
Figura 6 - Papel das sirtuínas na regulação de vias envolvidas no metabolismo.....	41
Figura 7 - Tempo de expressão/fosforilação de vários fatores importantes envolvidos na resposta adaptativa primária do músculo esquelético ao jejum.....	42
Figura 8 - Classificação e estrutura química dos polifenóis e dos principais flavonoides.....	43
Figura 9 - Estrutura química do kaempferol e seus principais glicosídeos.....	45
Figura 10 - Biossíntese do kaempferol.....	46
Figura 11 - Mecanismos de absorção e metabolismo do kaempferol no intestino delgado.....	48
Figura 12 - Absorção, metabolismo e excreção do kaempferol.....	51
Figura 13 - Estrutura química do resveratrol <i>trans</i> e <i>cis</i> , e seu principal glicosídeo.....	55
Figura 14 - Biossíntese do <i>trans</i> -resveratrol.....	56
Figura 15 - Absorção, metabolismo e excreção do <i>trans</i> -resveratrol.....	59
Figura 16 - Principais metabólitos do <i>trans</i> -resveratrol.....	60

### Metodologia

Figura 1 - Distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais.....	69
--	----

Figura 2 - Desenho experimental de acordo à metodologia do estudo.....	76
--	----

### **Resultados - Artigo Original 1**

Figura 1 - Peso corporal e porcentagem de ganho de peso de ratos machos durante o período de lactação.....	78
Figura 2 - Eixo-longitudinal de ratos machos durante o período de lactação.....	79
Figura 3 - Peso corporal e eixo-longitudinal de ratos machos pós-desmame.....	79
Figura 4 - Índice de massa corporal e índice de Lee de ratos machos.....	80
Figura 5 - Consumo alimentar relativo diário médio de ratos machos pós-desmame....	81
Figura 6 - Perfil glicêmico de ratos machos jovens.....	82
Figura 7 - Efeitos dos polifenóis sobre os parâmetros da atividade locomotora.....	85
Figura 8 - Efeitos dos polifenóis sobre o tempo de permanência em cada área do campo aberto.....	86

### **Resultados - Artigo Original 2**

Figura 1 - Evolução do peso corporal e crescimento dos animais após o tratamento com polifenóis.....	87
Figura 2 - Índice de massa corporal e índice de Lee de ratos machos.....	88
Figura 3 - Efeito do jejum de 24 horas na variação de peso corporal dos animais aos 30, 60 e 70 dias de idade.....	88
Figura 4 - Consumo alimentar relativo diário médio de ratos machos pós-desmame....	89
Figura 5 - Efeitos dos polifenóis e do status nutricional sobre os parâmetros da atividade locomotora aos 30 dias de idade.....	91
Figura 6 - Efeitos dos polifenóis e do status nutricional sobre o tempo de permanência em cada área do campo aberto aos 30 dias de idade.....	92
Figura 7 - Efeitos dos polifenóis e do status nutricional sobre os parâmetros da atividade locomotora aos 60 dias de idade.....	93
Figura 8 - Efeitos dos polifenóis e do status nutricional sobre os parâmetros da atividade locomotora aos 60 dias de idade.....	94

Figura 9 - Determinação do ponto de saciedade de ratos machos com 30 dias idade que foram submetidos a tratamento neonatal com polifenóis.....	95
Figura 10 - Determinação do ponto de saciedade de ratos machos com 60 dias idade que foram submetidos a tratamento neonatal com polifenóis.....	98

## LISTA DE TABELAS

### Revisão da Literatura

Tabela 1 - Quantidade de kaempferol em diferentes fontes.....	47
Tabela 2 - Quantidade de resveratrol em diferentes fontes.....	57

### Metodologia

Tabela 1 - Sequência de primer RT-qPC.....	75
--	----

### Resultados - Artigo Original 2

Tabela 1 - Parâmetros microestruturais da sequência comportamental de saciedade de ratos machos com 30 dias de idade que foram submetidos a tratamento neonatal com polifenóis.....	96
Tabela 2 - Número de animais que apresentaram ou não o comportamento de descanso durante a sequência comportamental de saciedade.....	97
Tabela 3 - Parâmetros microestruturais da sequência comportamental de saciedade de ratos machos com 60 dias de idade que foram submetidos a tratamento neonatal com polifenóis.....	99
Tabela 4 - Número de animais que apresentaram ou não o comportamento de descanso durante a sequência comportamental de saciedade.....	99
Tabela 5 - Perfil bioquímico e peso relativo de órgãos e tecidos de ratos machos aos 70 dias de idade.....	102
Tabela 6 - Expressão de genes relacionados ao metabolismo muscular de ratos machos com 70 dias de idade.....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
AGL	Ácidos graxos livres
AGNE	Ácidos graxos não esterificados
AgRP	Peptídeo relacionado a Agouti
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
BCRP1	Proteína de resistência ao câncer de mama 1
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro)
C4H	Cinamato-4-hidroxilase
CART	Transcrito relacionado a anfetamina e cocaína
CBG	$\beta$ -glicosidase citosólica
COMTs	Catecol-O-metiltransferases
COX	Ciclooxigenases
CPT-1	Carnitina palmitoiltransferase-1
DHR	Di-hidro-resveratrol
DOPAC	Ácido 3,4-di-hidroxifenilacético
EDL	Extensor longo dos dedos
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GLUT2	Transportador de glicose 2
GLUT4	Transportador de glicose 4
GSH-PX	Glutathiona peroxidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HK	Hexoquinase
IL-1, IL-6, IL8	Interleucinas 1, 6 e 8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.g.	Intragástrica
i.p.	Intraperitoneal

i.v.	Intravenosa
JAK2	Janus kinase 2
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LOX	Lipoxigenases
LPH	Lactase floridzina hidrolase
MAO	Monoamina oxidase
MAO-A	Monoamina oxidase A
MAO-B	Monoamina oxidase B
MC3R	Receptores de melanocortina 3
MC4R	Receptores de melanocortina 3
MDA	Malondialdeído
MHC1b	Cadeia pesada de miosina 1b
MRP3	Proteína de resistência a múltiplas drogas 3
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NPY	Neuropeptídeo Y
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Radical superóxido
OH	Radical hidroxila
<i>p</i> -HPAA	Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético
PAL	Fenilalanina amônia-liase
PDK	Piruvato desidrogenase quinase
PFK-1	Fosfofrutoquinase 1
PGC-1 $\alpha$	Coativador-1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
POMC	Proopiomelanocortina
PPAR $\delta$	Receptor delta ativado por proliferador de peroxissoma
SGLT1	Transportador de glicose dependente de sódio 1
SIRT1	Sirtuína 1
SIRT3	Sirtuína 3
SIRT <sub>s</sub>	Sirtuínas
SOD	Superóxido dismutase
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

STS	Estilbeno sintase
s.c.	Subcutânea
SULTs	Sulfotransferases
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
UGT	Uridina-5'-difosfato glucuronosiltransferases
v.o.	Via oral
$\alpha$ -MSH	Hormônio estimulador de $\alpha$ -melanócitos
4-HPAA	Ácido 4-hidroxifenilacético
4CL	4-cumarato-CoA ligase
5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	5-hidroxitriptamina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>25</b>
2.1	PLASTICIDADE E DESENVOLVIMENTO .....	25
2.2	ATIVIDADE LOCOMOTORA .....	27
2.3	COMPORTAMENTO ALIMENTAR .....	29
2.4	FLEXIBILIDADE METABÓLICA.....	33
2.5	POLIFENÓIS .....	43
<b>2.5.1</b>	<b>Kaempferol.....</b>	<b>44</b>
2.5.1.1	Características químicas do kaempferol .....	44
2.5.1.2	Biossíntese do kaempferol .....	45
2.5.1.3	Principais fontes alimentares do kaempferol.....	46
2.5.1.4	Farmacocinética do kaempferol .....	47
2.5.1.5	Principais atividades biológicas do kaempferol.....	51
2.5.1.5.1	<i>Atividade antioxidante do kaempferol .....</i>	<i>51</i>
2.5.1.5.2	<i>Atividade anti-inflamatória do kaempferol .....</i>	<i>52</i>
2.5.1.5.3	<i>Atividade antidiabética do kaempferol.....</i>	<i>53</i>
2.5.1.5.4	<i>Atividade neuroprotetora do kaempferol .....</i>	<i>53</i>
<b>2.5.2</b>	<b>Resveratrol.....</b>	<b>54</b>
2.5.2.1	Características químicas do resveratrol .....	54
2.5.2.2	Biossíntese do trans-resveratrol.....	55
2.5.2.3	Principais fontes alimentares do resveratrol .....	56
2.5.2.4	Farmacocinética do resveratrol .....	57
2.5.2.5	Principais atividades biológicas do resveratrol.....	60

2.5.2.5.1	<i>Atividade antioxidante do resveratrol</i> .....	60
2.5.2.5.2	<i>Atividade anti-inflamatória do resveratrol</i> .....	61
2.5.2.5.3	<i>Atividade antidiabética do resveratrol</i> .....	62
2.5.2.5.4	<i>Atividade neuroprotetora do resveratrol</i> .....	63
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>64</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>65</b>
4.1	GERAL .....	65
4.2	ESPECÍFICOS .....	65
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>66</b>
5.1	QUESTÕES ÉTICAS .....	66
5.2	ANIMAIS.....	66
5.3	ADMINISTRAÇÃO DOS POLIFENÓIS .....	67
5.4	MANIPULAÇÃO DO <i>STATUS</i> NUTRICIONAL AO SACRIFÍCIO.....	68
5.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	68
5.6	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....	69
<b>5.6.1</b>	<b>Avaliações somáticas dos filhotes</b> .....	<b>69</b>
<b>5.6.2</b>	<b>Avaliação da variação de peso corporal</b> .....	<b>70</b>
<b>5.6.3</b>	<b>Avaliação do consumo alimentar dos filhotes</b> .....	<b>70</b>
<b>5.6.4</b>	<b>Atividade locomotora</b> .....	<b>71</b>
<b>5.6.5</b>	<b>Sequência comportamental de saciedade</b> .....	<b>72</b>
<b>5.6.6</b>	<b>Teste de tolerância à glicose</b> .....	<b>73</b>
<b>5.6.7</b>	<b>Coleta de amostras</b> .....	<b>73</b>
<b>5.6.8</b>	<b>Análises bioquímicas</b> .....	<b>74</b>
<b>5.6.9</b>	<b>Análise da expressão de genes no músculo</b> .....	<b>74</b>

5.7	DESENHO EXPERIMENTAL DA METODOLOGIA .....	75
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	76
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>78</b>
6.1	ARTIGO ORIGINAL 1 - “EFEITOS DO USO NEONATAL DE KAEMPFEROL OU RESVERATROL NO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO E NA LOCOMOÇÃO DE RATOS MACHOS” .....	78
6.1.1	<b>Evolução do crescimento somático da prole durante o período de lactação e no pós-desmame .....</b>	<b>78</b>
6.1.2	<b>Avaliação do índice de massa corporal (IMC) e índice de Lee .....</b>	<b>80</b>
6.1.3	<b>Consumo alimentar relativo de ratos machos após o desmame .....</b>	<b>80</b>
6.1.4	<b>Efeitos do uso neonatal de polifenóis na resposta glicêmica .....</b>	<b>81</b>
6.1.5	<b>Efeitos dos polifenóis sobre a atividade locomotora .....</b>	<b>82</b>
6.2	ARTIGO ORIGINAL 2 - “REPERCUSSÕES DA ADMINISTRAÇÃO NEONATAL DE KAEMPFEROL OU RESVERATROL NA ATIVIDADE LOCOMOTORA, COMPORTAMENTO ALIMENTAR, PERFIL BIOQUÍMICO E FLEXIBILIDADE METABÓLICA MUSCULAR DE RATOS MACHOS” .....	87
6.2.1	<b>Crescimento somático dos animais após o tratamento com polifenóis.</b>	<b>87</b>
6.2.2	<b>Avaliação do índice de massa corporal (IMC) e índice de Lee .....</b>	<b>87</b>
6.2.3	<b>Efeito do jejum de 24 horas na variação de peso corporal.....</b>	<b>88</b>
6.2.4	<b>Consumo alimentar relativo diário médio de ratos machos após o desmame.....</b>	<b>89</b>
6.2.5	<b>Efeitos do uso neonatal de polifenóis e do status nutricional (alimentado ou jejum de 24 horas) sobre parâmetros da atividade locomotora em ratos machos com 30 e 60 dias de idade .....</b>	<b>89</b>
6.2.6	<b>Efeito do uso neonatal de polifenóis sobre o comportamento alimentar de ratos machos com 30 e 60 dias de idade.....</b>	<b>94</b>

6.2.7	Efeito do uso neonatal de polifenóis e do status nutricional (alimentado ou jejum de 24 horas) sobre o perfil bioquímico e peso relativo de órgãos e tecidos de ratos machos com 70 dias de idade .....	100
6.2.8	Polifenóis e resposta de expressão de genes relacionados ao metabolismo muscular .....	103
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	105
7.1	ARTIGO ORIGINAL 1 - “EFEITOS DO USO NEONATAL DE POLIFENÓIS NO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO, ATIVIDADE LOCOMOTORA E PERFIL GLICÊMICO DE RATOS” .....	105
7.1.1	<b>Polifenóis e o crescimento somático e consumo alimentar</b> .....	105
7.1.2	<b>Polifenóis e a resposta glicêmica</b> .....	107
7.1.3	<b>Polifenóis e a atividade locomotora</b> .....	111
7.2	ARTIGO ORIGINAL 2 - “REPERCUSSÕES DA ADMINISTRAÇÃO NEONATAL DE KAEMPFEROL E RESVERATROL NA FLEXIBILIDADE COMPORTAMENTAL E METABÓLICA MUSCULAR DE RATOS MACHOS”. .....	119
7.2.1	<b>Polifenóis e resposta comportamental ao jejum</b> .....	119
7.2.2	<b>Polifenóis e resposta metabólica ao jejum</b> .....	123
7.2.3	<b>Polifenóis e resposta de expressão de genes relacionados ao metabolismo muscular</b> .....	127
8	<b>CONCLUSÃO</b> .....	130
8.1	PERSPECTIVAS .....	130
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	131
	<b>ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> .....	150

## 1 INTRODUÇÃO

Durante o período perinatal, sob o abrigo materno intra e extrauterino, ocorrem fenômenos extraordinários, rápidos e intensos, concernentes ao crescimento e desenvolvimento do filhote mamífero (BARKER, 1991; BATESON *et al.*, 2004; GLUCKMAN, HANSON e BEEDLE, 2007) caracterizados por uma rápida hiperplasia, hipertrofia e diferenciação celular de órgãos e tecidos (DESAI e HALES, 1997). Esses acontecimentos nesses ambientes perinatais, por poderem induzir consequências a curto e a longo prazo durante toda vida, são considerados preditivos de mudanças subsequentes do fenótipo (BARKER, 1991; BATESON *et al.*, 2004; GLUCKMAN, HANSON e BEEDLE, 2007). Entende-se por fenótipo as características observáveis ou caracteres de um organismo de uma dada espécie, ou seja: morfologia, desenvolvimento, propriedades bioquímicas, propriedades fisiológicas, comportamento (DE VIENNE, 2022). O período perinatal de crescimento e desenvolvimento rápidos nos mamíferos, em particular nos filhotes murino e humano, revela-se crítico e vulnerável às mudanças ambientais (DOBBING, 1970; MORGANE *et al.*, 1993).

Nesse paradigma que destaca a relevância do ambiente na formação do fenótipo, vários estudos epidemiológicos e experimentais sobre o desenvolvimento de mamíferos, incluindo o rato e o homem, demonstram que variações ambientais na vida perinatal podem levar às mudanças fenotípicas com repercussões na vida adulta, por vezes, deletérias e, por vezes, benéficas no sentido evolutivo (DE MOURA, LISBOA e PASSOS, 2008; ALFARADHI e OZANNE, 2011; BENTO-SANTOS *et al.*, 2012). A nutrição é uma das variáveis mais bem documentadas no estudo da plasticidade fenotípica por ser fator ambiental imprescindível para o crescimento e o desenvolvimento do organismo em todas as espécies (MORGANE *et al.*, 1993; BATESON *et al.*, 2004; WALKER, 2005; GLUCKMAN *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, tem ganhado espaço o estudo de certos componentes que formam parte dos alimentos chamados de “compostos bioativos” que podem ter efeitos benéficos, inclusive protetores, que atuam através de mecanismos epigenéticos semelhantes àqueles que interferem na plasticidade fenotípica (STEVANOVIC, DIOUF e GARCÍA-PÉREZ, 2009). Dentre esses componentes, destacam-se os polifenóis,

abundantes nas frutas, vegetais e chás (BARET *et al.*, 2013). Os quais apresentam uma ampla gama de propriedades anticancerígenas, antiteratogênicas, cardioprotetoras e neuroprotetoras (STEVANOVIC, DIOUF e GARCÍA-PÉREZ, 2009).

Os polifenóis formam parte das estratégias nutricionais que auxiliam no tratamento de doenças crônicas não transmissíveis como a obesidade, dislipidemias, diabetes e suas complicações (CORY *et al.*, 2018; GROSSO, 2018; KOCH, 2019; SANCHES-SILVA *et al.*, 2020; FELDMAN *et al.*, 2021; LACERDA *et al.*, 2022) por serem capazes de modular o metabolismo da glicose, perfil de lipídios, atividade hormonal e enzimática (VINAYAGAM e XU, 2015; FELDMAN *et al.*, 2021). Isso não significa que indivíduos saudáveis não possam se beneficiar da inclusão dos polifenóis através da alimentação, já que o consumo de frutas e hortaliças, fonte de polifenóis, são marcadores de padrões saudáveis de alimentação e seu consumo está associado a menor risco de apresentar doenças crônicas não transmissíveis (GROSSO, 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o consumo diário de frutas e hortaliças deveria ser de 400 gramas, o que equivale, aproximadamente, ao consumo diário de cinco porções desses alimentos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Dados do Sistema de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (VIGITEL), realizado na população adulta ( $\geq 18$  anos), mostram que, a frequência do consumo regular de frutas e hortaliças é de 34,2%, sendo maior entre as mulheres (41,0%) do que entre os homens (26,2%) e a frequência de consumo recomendado de frutas e hortaliças é de 22,1%, sendo maior entre as mulheres (26,4%) do que entre homens (16,9%) (VIGITEL, 2021). Em relação, as crianças menores de 5 anos, o Estudo Nacional de Alimentação e Nutrição Infantil (ENANI) revelou que, a prevalência do não consumo de frutas e hortaliças entre crianças de 6 a 23 meses de idade foi de 22,2% e de 27,4% entre crianças de 24 a 59 meses de idade para o Brasil (ENANI, 2019).

Dentre os polifenóis, com importantes atividades biológicas, destacam-se o kaempferol e o resveratrol (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; WEN *et al.*, 2021; CIANCIOSI *et al.*, 2022). O kaempferol possui importante efeito sobre a captação de glicose no músculo esquelético (ZANATTA *et al.*, 2008), reversão de dislipidemias (KONG *et al.*, 2013; KADIOGLU *et al.*, 2015), ativação do hormônio tireoídiano,

consequentemente, aumentando o gasto energético (DA-SILVA *et al.*, 2007). Em relação ao resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene), estudos clínicos sugerem que o resveratrol é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina e reduzir os níveis plasmáticos de glicose e insulina em pacientes com diabetes tipo 2 e atuar de maneira semelhante à restrição calórica em indivíduos obesos (TIMMERS *et al.*, 2011; BHATT, THOMAS e NANJAN, 2012). Estudos em animais tem demonstrado que o resveratrol pode estimular o gasto de energia e proteger contra o ganho de peso induzido por uma dieta rica em gordura (BAUR *et al.*, 2006; LAGOUGE *et al.*, 2006; SHANG *et al.*, 2008).

Dentre os diversos comportamentos que são maturados durante o período pós-natal inicial, temos o comportamento motor cujo componente da locomoção é bastante estudado (WESTERGA e GRAMSBERGEN, 1990; JORDAN, 1998). Para que aconteça um adequado desenvolvimento da atividade locomotora precisa-se da integridade, maturação e integração entre sistema nervoso central (SNC) e musculoesquelético (FOX, 1965; GRAMSBERGEN, 1998). A embriogênese muscular ocorre precocemente no desenvolvimento, sendo que o período pós-natal precoce também apresenta grande importância por ser o período de diferenciação e estabelecimento do fenótipo muscular (PUNKT, NAUPERT e ASMUSSEN, 2004).

Por ser um órgão extremamente plástico, o músculo esquelético, pode apresentar variações no tamanho, metabolismo e propriedades funcionais devido à condição fisiológica ou patológica (HARRIDGE, 2007; BAAR, 2010). Dessa forma, o músculo esquelético é considerado um dos tecidos que governam a flexibilidade metabólica (SMITH *et al.*, 2018). A flexibilidade metabólica pode ser definida como a capacidade de um organismo de responder ou se adaptar de acordo com as mudanças na demanda metabólica ou energética, ao jejum periódico, a composição variável das refeições, a atividade física e as flutuações ambientais (GOODPASTER e SPARKS, 2017; SMITH *et al.*, 2018).

A flexibilidade metabólica é considerada essencial para manter a homeostase energética em tempos de excesso calórico ou restrição calórica (SMITH *et al.*, 2018). Dentre o complexo controle da flexibilidade metabólica também devemos considerar as mudanças comportamentais que estão ligadas ao consumo alimentar e a procura por

alimento (influenciando a locomoção) e não somente às questões do metabolismo propriamente (JORDAN, 1998).

Diante do exposto, ambos polifenóis apresentam efeitos benéficos à saúde. No entanto, ainda são escassos os estudos que avaliem em modelos experimentais a utilização do kaempferol ou resveratrol durante o período crítico do desenvolvimento. Dessa forma, a pergunta condutora desta tese foi: “Quais serão os efeitos da utilização precoce de kaempferol ou resveratrol sobre o crescimento somático, desenvolvimento da locomoção, comportamento alimentar, perfil bioquímico e expressão gênica de marcadores de metabolismo muscular de ratos machos? Além disso, qual será a resposta desses parâmetros diante o desafio metabólico de jejum de 24 horas?

A pesquisa foi desenvolvida em colaboração com os laboratórios da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE): Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT), Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB), Unidade de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica (UENPF), e o Laboratório de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória (CAV).

O estudo gerou dois artigos científicos originais, os quais serão enviados para publicação após correções. O primeiro artigo intitulado “***Efeitos do uso neonatal de kaempferol ou resveratrol no desenvolvimento somático e na locomoção de ratos machos***”. O segundo artigo intitulado “***Repercussões da administração neonatal de kaempferol ou resveratrol na atividade locomotora, comportamento alimentar, perfil bioquímico e flexibilidade metabólica muscular de ratos machos***”.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PLASTICIDADE E DESENVOLVIMENTO

Dobbing (1965) formulou o conceito de “período crítico do desenvolvimento” que corresponde às janelas de tempo em que os tecidos e órgãos são susceptíveis a injúrias, desenvolvendo alterações permanentes na estrutura e função. Em seu trabalho, Dobbing focou-se no período crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso central, porém, hoje se sabe que todos os sistemas apresentam períodos de rápida proliferação e diferenciação celular em que estão mais vulneráveis a insultos ambientais (DOBBING, 1965; CAMERON e DEMERATH, 2002). Esses períodos críticos para o desenvolvimento correspondem, no homem, à gestação, lactação e primeira infância (CAMERON e DEMERATH, 2002) em que órgãos e sistemas do corpo apresentam grande plasticidade (BARKER, 2003).

A plasticidade do desenvolvimento é definida como o fenômeno pelo qual um genótipo pode dar origem a diferentes estados fisiológicos ou morfológicos em resposta a diferentes condições ambientais durante o desenvolvimento (WEST-EBERHARD, 2005). Dessa forma, a plasticidade do desenvolvimento permite ao organismo em formação modificar sua trajetória de crescimento e desenvolvimento através de processos adaptativos (GLUCKMAN, HANSON e PINAL, 2005).

No humano, o desenvolvimento do SNC caracteriza-se por eventos que ocorrem desde o primeiro trimestre de gestação até o início do segundo ano de vida (MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002). Considerando a curva de crescimento cerebral, podemos observar que a maior taxa de mudanças ocorre, no homem, do último trimestre de gestação ao segundo semestre pós-natal (MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002). No rato, o desenvolvimento do SNC segue o mesmo perfil de maturação, sendo observadas diferenças em relação aos humanos apenas no período em que cada estágio acontece (MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002). Por exemplo, no rato, a maior velocidade de modificações durante a maturação do SNC ocorre nas três primeiras semanas após o parto (MORGANE, MOKLER e GALLER, 2002).

Considerando esse período de grande plasticidade, sabe-se que o organismo em desenvolvimento se adapta às condições ambientais, como, por exemplo, de baixo

aporte nutricional, modificando sua trajetória de crescimento e metabolismo no sentido de melhorar o aproveitamento energético e aumentar a capacidade de armazenar energia (HALES e BARKER, 1992). Esta hipótese foi denominada a hipótese do fenótipo poupador segundo Hales e Barker (HALES e BARKER, 1992). Contudo, Wells (2010) propôs um novo modelo para explicar a relação entre o ambiente perinatal, a trajetória de desenvolvimento do indivíduo e o aparecimento de doenças na vida adulta. Este modelo é constituído de dois componentes de fenótipo metabólico: “capacidade metabólica” que seria representada pelo peso ao nascer e “carga metabólica” que seria a trajetória de crescimento podendo ser representado pelo ganho de peso, estatura, massa gorda ou massa magra (WELLS, 2010). Por conseguinte, o risco do aparecimento da síndrome metabólica e doença cardiovascular podem ser atribuídos à razão de carga metabólica para capacidade metabólica (WELLS, 2010). Por exemplo, Wells (2010) observou crianças que nascem com baixo peso corporal (ou seja, baixa capacidade metabólica) e que tem crescimento acelerado (ou seja, alta carga metabólica), possuem grande carga sobre uma pequena capacidade, e essa incompatibilidade estaria relacionada com a prevalência de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta.

Desta forma, o excesso de nutrientes no período fetal e na infância predispõe o indivíduo adulto a doenças cardiovasculares e diabetes tipo II, ou aos fatores de risco associados, como a hipertensão, a intolerância à glicose e a hiperlipidemia (ARMITAGE *et al.*, 2004; ARMITAGE, TAYLOR e POSTON, 2005; BARKER, 2007; TAYLOR e POSTON, 2007). Tanto a hipótese do fenótipo poupador (*thrifty phenotype hypothesis*) quanto o modelo de capacidade-carga metabólica estão inseridos na “Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença” ou, em termos mais amplos, na “Plasticidade Fenotípica”. Os processos envolvidos nesse fenômeno ainda não estão totalmente esclarecidos, mas parecem estar relacionados a mecanismos epigenéticos (GLUCKMAN, HANSON e PINAL, 2005; HANSON e GLUCKMAN, 2011).

Os efeitos epigenéticos são gerados por meio de modificações químicas sobre as proteínas histonas e o DNA que compõem a cromatina, com consequente efeito sobre a expressão de genes (WELLS, 2010). Este processo permite que a reprogramação do fenótipo materno influencie o perfil epigenético da prole, gerando

efeitos em longo prazo sobre seu fenótipo (WELLS, 2010). As alterações fenotípicas ocorrem devido aos sinais que o ambiente envia ao feto e ao indivíduo em desenvolvimento, como estratégia de prepará-lo as condições futuras previstas (HANSON e GLUCKMAN, 2011).

## 2.2 ATIVIDADE LOCOMOTORA

Os eventos relacionados ao desenvolvimento da locomoção seguem uma sequência pré-determinada e característica nas diferentes espécies (MUIR, 2000). Em ratos, esta sequência já foi observada e descrita na literatura (WESTERGA e GRAMSBERGEN, 1990) e ocorre de maneira coordenada, sendo necessárias: integridade, maturação e integração entre os sistemas nervoso central (SNC) e o musculoesquelético (FOX, 1965; GRAMSBERGEN, 1998).

No rato, a maior parte das projeções descendentes cerebrais, que iniciam e modulam o movimento, alcança a medula espinhal alguns dias antes do nascimento (CLARAC *et al.*, 1998; JORDAN, 1998). Na primeira semana pós-natal são adquiridos o controle inicial da cabeça e dos membros anteriores (CLARAC *et al.*, 1998; VINAY *et al.*, 2005). Neste período, a principal atividade locomotora no rato consiste em rastejar de forma ineficiente, apenas com a utilização das patas anteriores, já que os membros posteriores se apresentam em extensão (CLARAC *et al.*, 1998; GRAMSBERGEN, 1998).

Movimentos de flexão e extensão laterais do tronco, também são apresentados nesse período, os quais favorecem o pivoteamento do animal e auxiliam na ativação da musculatura do tronco (GRAMSBERGEN, 1998). Desta forma, rastejamento e pivoteamento são os tipos de locomoção predominantes até a metade da segunda semana pós-natal (WESTERGA e GRAMSBERGEN, 1990; CLARAC *et al.*, 1998). Durante este período, o animal começa a apresentar melhor ativação da musculatura extensora dos membros posteriores (BROCARD, VINAY e CLARAC, 1999).

A partir da metade da segunda semana, o animal já consegue caminhar sustentando seu peso sobre as quatro patas (CLARAC *et al.*, 1998). A partir do 11º dia pós-natal em diante, uma transição ocorre do rastejar para a caminhada com a

superfície ventral do corpo longe do chão (WESTERGA e GRAMSBERGEN, 1990). A partir de então, há uma rápida maturação funcional dos membros posteriores (CLARAC *et al.*, 1998) e aumento da atividade exploratória (BÂ e SERI, 1995). No 14º dia pós-natal, aparecem os primeiros movimentos verticais (CLARAC *et al.*, 1998).

Ao final da segunda semana de vida, os padrões de movimento e locomoção apresentam-se semelhantes aos do animal adulto (WESTERGA e GRAMSBERGEN, 1990; BÂ e SERI, 1995; CLARAC *et al.*, 1998; GRAMSBERGEN, 1998). Contudo, até o 21º dia pós-natal, ainda ocorrerão melhora na ativação da musculatura e maturação de algumas vias descendentes, até atingirem o nível de função do animal adulto (CLARAC *et al.*, 1998; GRAMSBERGEN, 1998; GRAMSBERGEN *et al.*, 1999) permitindo a realização de movimentos mais complexos (BÂ e SERI, 1995).

A partir do desmame, ou seja, 21º dia pós-natal, há coincidência na ativação da musculatura do tronco e membros inferiores, indicando que estes apresentarão maior papel na propulsão (GRAMSBERGEN *et al.*, 1999) tornando a locomoção mais eficiente do ponto de vista metabólico (GRAMSBERGEN *et al.*, 1999). Do 25º até 45º dia pós-natal, observa-se aumento da atividade locomotora e diminuição da atividade exploratória (BÂ e SERI, 1995).

Segundo Sinnamon (1993) a locomoção pode ser induzida por diferentes circunstâncias comportamentais. Nesse sentido, ele diferenciou três tipos de sistemas que motivariam a locomoção: “sistema relacionado ao apetite” “sistema exploratório” e “sistema defensivo” (SINNAMON, 1993). Dessa forma, a locomoção desempenha papéis diferentes nos três sistemas. Para o sistema relacionado ao apetite, a locomoção permite ao animal entrar em contato com estímulos de incentivo, como o alimento e consumação (por exemplo, comer). Para o sistema defensivo, a locomoção atua aumentando a distância entre o animal e estímulos ameaçadores ou dolorosos. No sistema exploratório, a locomoção é direcionada a estímulos distais os quais estão relacionados com as características do ambiente (SINNAMON, 1993). Segundo Kelley (1993), animais submetidos a privação de alimento podem ser mais ativos e podem explorar mais o ambiente do que os animais saciados. O aumento da atividade locomotora durante a restrição alimentar é interpretado como o reflexo do aumento no comportamento de forrageamento “a busca pelo alimento”, o que pode aumentar as

chances de sobrevivência do animal (CAMPBELL, TEGHTSOONIAN e WILLIAMS, 1961; CORNISH e MROSOVSKY, 1965; JORDAN, 1998; HUANG, SHYU e HSIAO, 2010). No estudo de Zhu e colaboradores (2014) ratos machos adultos submetidos a privação alimentar mostraram maior atividade geral (movimentos ativos, como caminhar ao redor da gaiola) em relação ao grupo controle (alimentado *ad libitum*). Resultados semelhante foram encontrados em camundongos (WILLIAMS *et al.*, 2002), o que indica que roedores aumentam sua atividade locomotora para procurar alimento quando este é limitado ou imprevisível (ZHU *et al.*, 2014). Por outro lado, no sentido metabólico, o músculo esquelético apresenta um aumento de sua respiração mitocondrial sob restrição alimentar, o que, hipoteticamente, poderia levar a um incremento em seu desempenho locomotor em um cenário de baixa disponibilidade de alimentos (HEMPENSTALL *et al.*, 2012; PEÑA-VILLALOBOS *et al.*, 2020). Nesse sentido, a fim de manter o balanço energético, os animais frequentemente apresentam diversos ajustes fisiológicos quando submetidos a uma diminuição na disponibilidade de alimento. Especificamente, alguns roedores apresentam aumento na atividade comportamental em resposta à restrição alimentar, resposta tida como paradoxal porque implicaria um investimento na atividade locomotora, apesar da falta de recursos energéticos (PEÑA-VILLALOBOS *et al.*, 2020).

### 2.3 COMPORTAMENTO ALIMENTAR

O comportamento alimentar pode ser definido como a interação entre os eventos psicológicos, fisiológicos e metabólicos que estão relacionados com os níveis de neurotransmissores e de interações metabólicas no cérebro (BLUNDELL, GOODSON e HALFORD, 2001; OLIVEIRA, SOUZA e MANHÃES-DE-CASTRO, 2011; LIU e KANOSKI, 2018). A regulação do comportamento alimentar é frequentemente dividida em mecanismos homeostáticos e não homeostáticos (LIU e KANOSKI, 2018). Mecanismos homeostáticos controlam a alimentação em resposta ao déficit geral de energia ou outros tipos de necessidades metabólicas, enquanto mecanismos não homeostáticos incluem aprendizado, memória e processos cognitivos que podem afetar

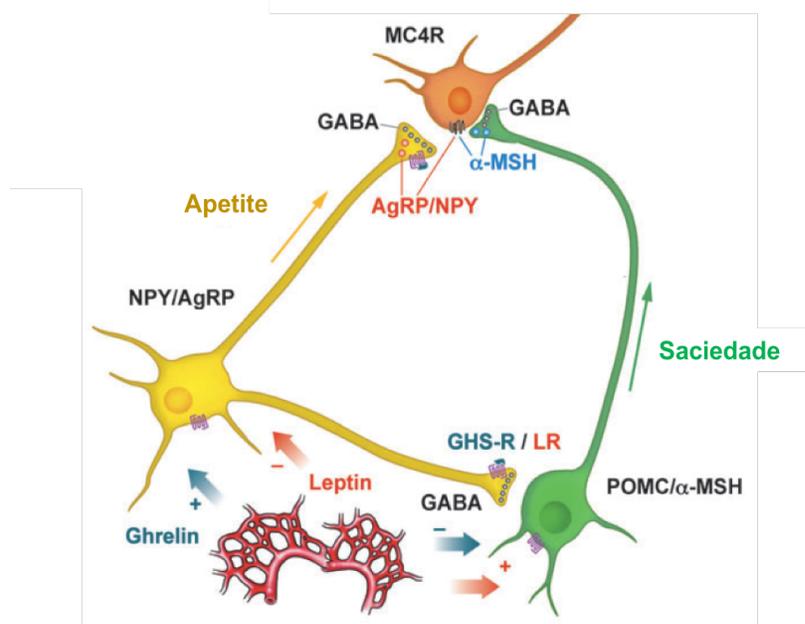
a alimentação com base em experiências anteriores aprendidas e aspectos hedônicos do alimento (LIU e KANOSKI, 2018).

O hipotálamo é a região do cérebro que controla a ingestão de alimentos e o peso corporal (LIU e KANOSKI, 2018). Está constituído por vários núcleos especializados que regulam o balanço energético, dentre eles o núcleo arqueado hipotalâmico, núcleo paraventricular, hipotálamo ventromedial e hipotálamo lateral (WATERSON e HORVATH, 2015; QIN, LI e TANG, 2018). O núcleo arqueado hipotalâmico está situado perto do terceiro ventrículo e da eminência mediana, que é uma área com uma barreira hematoencefálica relativamente porosa (ROH e KIM, 2016). Isso fornece ao núcleo arqueado hipotalâmico livre acesso a nutrientes e hormônios circulantes, tornando-o o principal centro de detecção de nutrientes do hipotálamo (ROH e KIM, 2016). Existem duas populações neuronais distintas no núcleo arqueado hipotalâmico, neurônios orexígenos que expressam tanto o neuropeptídeo Y (NPY) quanto o peptídeo relacionado ao Agouti (AgRP) e neurônios anorexígenos que expressam proopiomelanocortina (POMC) e o transcrito relacionado a anfetamina e cocaína (CART) (HUNTER *et al.*, 2004; LIU e KANOSKI, 2018; PATEL, ACHARYA e THERAPEUTICS, 2019). Esses neurônios são neurônios de primeira ordem que respondem a sinais metabólicos periféricos e se projetam para neurônios de segunda ordem dos núcleos paraventricular e hipotálamo lateral (Figura1) (LIU e KANOSKI, 2018).

Os neurônios POMC produzem o hormônio estimulador de  $\alpha$ -melanócitos do peptídeo anorexígeno ( $\alpha$ -MSH) pelo processamento pós-transcricional de POMC (COWLEY *et al.*, 1999). A  $\alpha$ -MSH se liga aos receptores de melanocortina 3 e 4 (MC3R e MC4R) em neurônios de segunda ordem e ativa as vias catabólicas, levando à redução da ingestão de alimentos e aumento do gasto energético (COWLEY *et al.*, 1999). Por outro lado, o NPY aumenta a ingestão alimentar via receptores, que são altamente expressos no núcleo arqueado hipotalâmico, núcleo paraventricular e hipotálamo ventromedial (RAPOSINHO *et al.*, 2001; LIU e KANOSKI, 2018). Da mesma forma, o AgRP induz hiperfagia e ganho de peso ao inibir a ligação de  $\alpha$ -MSH a MC3R/MC4R (Figura 1) (SCHWARTZ *et al.*, 2000). A ablação seletiva de neurônios NPY/AgRP em camundongos adultos resulta em anorexia e perda de peso (LUQUET *et*

*al.*, 2005), demonstrando o papel crítico desses neurônios na regulação da homeostase energética.

Figura 1 - Neurônios anorexígenos e orexígenos no processo de apetite e saciedade.



**Fonte:** Adaptado de GAO e HORVATH, 2007.

AgRP: peptídeo relacionado ao Agouti; α-MSH: hormônio estimulador de α-melanócitos; MC4R: receptor de melanocortina 4; NPY: neuropeptídeo Y; POMC: proopiomelanocortina.

Os neurônios NPY/AgRP são modulados por inúmeros hormônios, como a leptina, insulina e grelina (LOH *et al.*, 2017). A grelina é um hormônio intestinal secretado pelo estômago durante o jejum, sinalizando a necessidade de aumentar a ingestão de alimentos (YANAGI *et al.*, 2018). A leptina e a insulina sinalizam o estado das reservas de energia do corpo para o hipotálamo (ELIAS *et al.*, 1999). Tanto a leptina quanto a insulina são hormônios que ativam os neurônios POMC, enquanto inibem os neurônios NPY/AgRP (ELIAS *et al.*, 1999). O jejum tem a capacidade de reduzir os níveis de leptina que pode estar subjacente às respostas dos neurônios NPY/AgRP e POMC no núcleo arqueado hipotalâmico (HAHN *et al.*, 1998). Além disso, o jejum aumenta a expressão dos neurônios NPY/AgRP hipotalâmicos e inibe a sinalização de vias que contêm peptídeos anorexígenos, como a das melanocortinas (HAHN *et al.*, 1998).

Neurônios hipotalâmicos, particularmente aqueles que se encontram no núcleo arqueado hipotalâmico e hipotálamo ventromedial, respondem diretamente à disponibilidade de combustíveis no corpo (STORLIEN, 1985; MCCRIMMON *et al.*, 2004; MINOKOSHI *et al.*, 2004). A exemplo, níveis de glicose extracelular elevados ativam os neurônios POMC, enquanto os neurônios NPY/AgRP são ativados em condições de privação de glicose (IBRAHIM *et al.*, 2003; ROH e KIM, 2016). Células hipotalâmicas também são sensíveis aos ácidos graxos livres circulantes, provavelmente mediados pela proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (KIM *et al.*, 2004; LANDREE *et al.*, 2004). A ativação da AMPK pode controlar as respostas hipotalâmicas aos hormônios periféricos, uma vez que a grelina aumenta a atividade hipotalâmica da AMPK (KOLA *et al.*, 2005). Assim como a grelina, AgRP e o jejum aumentam a atividade da AMPK no hipotálamo (KIM *et al.*, 2004; MINOKOSHI *et al.*, 2004).

O comportamento alimentar, em roedores, pode ser avaliado através da Sequência Comportamental de Satedade (SCS) (HALFORD, WANNINAYAKE e BLUNDELL, 1998; OLIVEIRA, SOUZA e MANHÃES-DE-CASTRO, 2011). A SCS foi utilizada pela primeira vez em 1975 como modelo experimental para o estudo da satedade (HALFORD, WANNINAYAKE e BLUNDELL, 1998) e está constituída pela transição de três fases: começa com a alimentação, seguida de atividades de limpeza e locomoção e termina com a fase de descanso (HALFORD, WANNINAYAKE e BLUNDELL, 1998). A alimentação propriamente dita caracteriza-se por morder, roer ou engolir alimentos diretamente do comedouro ou das patas dianteiras (HALFORD, WANNINAYAKE e BLUNDELL, 1998). Essa ação está relacionada à necessidade biológica de obtenção de nutrientes (HALFORD, WANNINAYAKE e BLUNDELL, 1998). Após a alimentação, acontece a atividade de limpeza que é caracterizada por lambe o corpo, pés e genitais, coçar a pelagem ou a cabeça com a pata traseira, acariciar os bigodes com as patas e morder a cauda (HALFORD, WANNINAYAKE e BLUNDELL, 1998). A locomoção envolve movimentos com a participação das quatro patas e ficar na posição vertical/*rearing* (patas dianteiras levantadas do chão da gaiola, apoiadas contra uma parede ou em pé) (HALFORD, WANNINAYAKE e BLUNDELL, 1998). Por último, o descanso é caracterizado pela inatividade, condição causada pela satedade (ANTIN *et al.*, 1975). A satedade envolve os eventos subsequentes à ingestão de alimentos que

suprimem a fome e mantêm uma inibição para comer por um determinado período de tempo (BLUNDELL, GOODSON e HALFORD, 2001). O ponto de saciedade, na SCS, corresponde à transição da alimentação para o descanso (ISHII *et al.*, 2003).

A SCS geralmente é avaliada durante 60 minutos (ANTIN *et al.*, 1975; CHAVES *et al.*, 2020; DE SOUZA *et al.*, 2020). Contudo, a depender do protocolo experimental utilizado, alguns pesquisadores têm usado um período de observação que varia entre 40 minutos (HALFORD e BLUNDELL, 1996; HEWITT *et al.*, 2002; OROZCO-SÓLIS *et al.*, 2009) e 90 minutos (SCOTT *et al.*, 2005). Prévio ao teste de SCS, os estudos costumam utilizar um período de privação alimentar de quatro horas (HALFORD e BLUNDELL, 1996; HALFORD, LAWTON e BLUNDELL, 1997; DE SOUZA *et al.*, 2020). No entanto, períodos maiores de privação alimentar têm sido usados (ISHII *et al.*, 2003). No estudo de Ishii *et al.* (2003) observou-se que quanto maior o período de jejum (6 e 12 horas), maior a ingestão alimentar e a duração da alimentação. Animais com jejum de 20 horas, prévio ao teste de SCS, mostraram diminuição do tempo de latência alimentar (tempo em que o animal demora em iniciar a alimentação) (BLUNDELL, ROGERS e HILL, 1985). Esses estudos indicam que a análise da SCS é um método simples usado para estabelecer a microestrutura do comportamento alimentar (ISHII *et al.*, 2003). Ou seja, definir a duração e/ou frequência de cada comportamento associado à ingestão alimentar (ISHII *et al.*, 2003). Visto que a simples mensuração da quantidade de alimento ingerido por si só não permite determinar se as alterações na ingestão de alimentos se devem a alteração dos mecanismos fisiológicos que regulam a ingestão de alimentos ou a efeitos inespecíficos, como a sedação, hiperatividade, mal-estar (OLIVEIRA, SOUZA e MANHÃES-DE-CASTRO, 2011). Desta forma a SCS, torna-se uma ferramenta experimental sólida para melhorar a compreensão dos complexos processos psicológicos e fisiológicos envolvidos na regulação do comportamento alimentar (OLIVEIRA, SOUZA e MANHÃES-DE-CASTRO, 2011).

## 2.4 FLEXIBILIDADE METABÓLICA

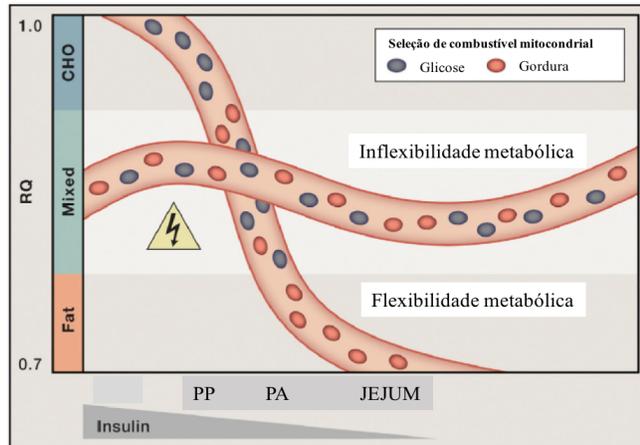
A flexibilidade metabólica pode ser definida como a capacidade de um organismo de responder ou se adaptar de acordo com as mudanças na demanda

metabólica ou energética, ao jejum periódico, a composição variável das refeições, a atividade física e as flutuações ambientais (GOODPASTER e SPARKS, 2017; SMITH *et al.*, 2018). A flexibilidade metabólica é considerada essencial para manter a homeostase energética em tempos de excesso calórico ou restrição calórica (SMITH *et al.*, 2018). O fígado, o tecido adiposo e o músculo esquelético governam a flexibilidade metabólica e gerenciam a detecção, absorção, transporte, armazenamento e gasto de nutrientes através de sinais endócrinos (SMITH *et al.*, 2018).

Em 1983 foi definida como plasticidade metabólica, após avaliações das adaptações metabólicas do músculo esquelético ao exercício. No entanto, Kelley e colaboradores (1999) definiram o termo flexibilidade metabólica, quando estudaram a seleção de combustível no músculo esquelético em indivíduos eutróficos e obesos após jejum noturno. Eles observaram que o músculo esquelético de indivíduos eutróficos mostrou maior habilidade de se adaptar à preferência de combustível ao jejum, portanto, foram designados como metabolicamente flexíveis (Figura 2) (KELLEY *et al.*, 1999).

Battaglia e colaboradores (2012) observaram que, após o consumo de uma dieta rica em gordura, indivíduos eutróficos com flexibilidade metabólica adequada foram capazes de aumentar a oxidação de ácidos graxos, corroborada através do aumento da expressão de genes envolvidos no transporte e oxidação de ácidos graxos. Por outro lado, pacientes obesos e resistentes à insulina manifestaram menor dependência da oxidação de ácidos graxos, quando comparados com indivíduos eutróficos e não mostraram aumento da oxidação de ácidos graxos após o jejum, por causa de sua resposta inadequada ao desafio metabólico (jejum), esses pacientes foram denominados de "metabolicamente inflexíveis" (Figura 2) (KELLEY e MANDARINO, 2000).

Figura 2 - Seleção de combustível pela mitocôndria.



**Fonte:** MUOIO, 2014.

Em indivíduos saudáveis, metabolicamente flexíveis, o consumo de uma refeição rica em carboidratos (CHO) juntamente com um pequeno aumento nos níveis de insulina no sangue, provocam um aumento no quociente respiratório (RQ), indicativo de uma mudança robusta de oxidação ácido graxo para glicose. Durante o tempo pós-prandial (PP), as mitocôndrias consomem uma mistura de gorduras e carboidratos. A progressão para o estado pós-absortivo (PA) e o jejum prolongado são acompanhados por aumento da oxidação de gordura e um declínio correspondente no RQ.

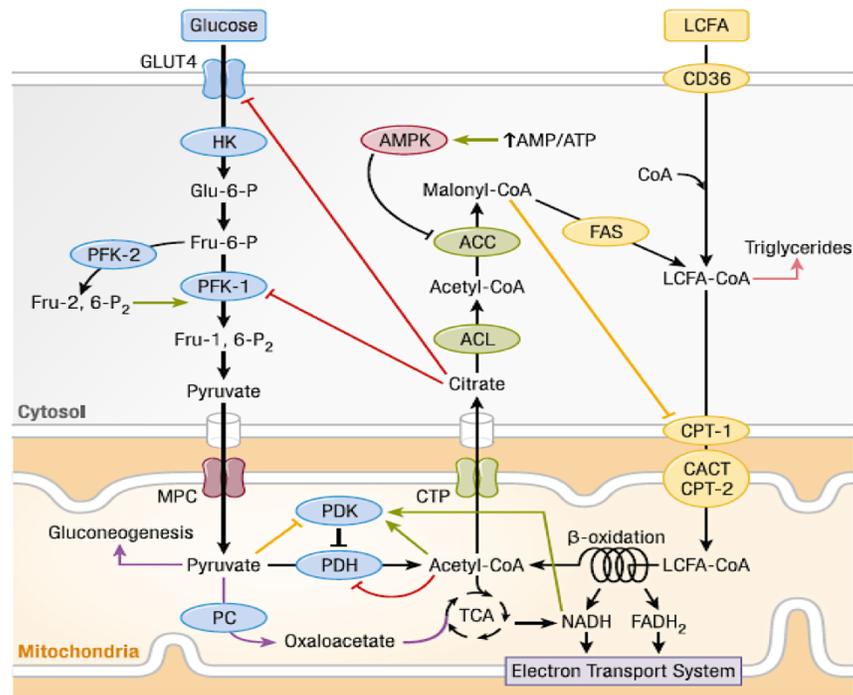
Em indivíduos saudáveis, o metabolismo é evidentemente diferente durante a privação de energia (jejum) e durante a disponibilidade calórica (SMITH *et al.*, 2018). Durante o jejum, os lipídios são mobilizados do tecido adiposo como ácidos graxos livres (AGL) para fornecer energia aos tecidos periféricos como coração, músculo esquelético e fígado, seja diretamente pela oxidação de ácidos graxos ou indiretamente por corpos cetônicos sintetizados a partir do excesso de AGL que chegam ao fígado, que posteriormente podem ser oxidados pelos tecidos periféricos (NEUMANN-HAEFELIN *et al.*, 2004).

Consequente, à privação de energia, altas taxas de  $\beta$ -oxidação são observadas, com aumento de acetil-CoA, que reduz a oxidação da glicose pela inibição alostérica da piruvato desidrogenase (PDH) e pela ativação de sua quinase inibitória, a piruvato desidrogenase quinase (PDK) (MUOIO, 2014; SMITH *et al.*, 2018). Além disso, níveis aumentados de citrato inibem GLUT4 e fosfofrutoquinase 1 (PFK-1). A inibição de PFK-1 resulta em concentrações aumentadas de glicose-6-fosfato que inibem a hexoquinase (HK) (Figura 3) (MUOIO, 2014; SMITH *et al.*, 2018).

Durante o período pós-prandial de uma refeição rica em carboidratos, as células  $\beta$  do pâncreas respondem ao aumento de glicose liberando insulina na corrente

sanguínea, aumentando a razão insulina-glucagon (DIMITRIADIS *et al.*, 2011). A captação de glicose, a glicólise e a oxidação do piruvato são favorecidas e a oxidação de ácidos graxos é suprimida (SMITH *et al.*, 2018). O aumento da concentração de malonil-CoA inibe alostericamente à carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT-1), que transporta ácidos graxos para as mitocôndrias para a  $\beta$ -oxidação (SMITH *et al.*, 2018). A inibição da CPT-1 aumenta a concentração de ácidos graxos de cadeia longa, que então são usados para a síntese de triglicerídeos e armazenados (SMITH *et al.*, 2018). Além disso, o aumento do piruvato a partir da glicólise inibe a PDK, que reduz a fosforilação das PDHs, resultando em aumento da oxidação da glicose (Figura 3) (SMITH *et al.*, 2018).

Figura 3 - Mecanismo de oxidação de glicose e ácidos graxos durante o estado alimentado e de jejum.



**Fonte:** SMITH *et al.*, 2018.

ACC: acetil-CoA carboxilase; ACL: ATP-citrato liase; AMPK: proteína quinase ativada por AMP; CPT-1: carnitina palmitoiltransferase-1; CACT: carnitina-acilcarnitina translocase; CTP: proteína de transporte de citrato; GLUT4: transportador de glicose 4; HK: hexoquinase; LCFA: ácidos graxos de cadeia longa; LCFA-CoA: acil-CoA de cadeia longa; PC: piruvato carboxilase; PDH: piruvato desidrogenase; PDK: piruvato desidrogenase quinase; PFK-1: fosfofrutoquinase 1. As setas verdes indicam reações de estimulação. As setas vermelhas, amarelas e pretas achatadas indicam inibição.

O músculo esquelético apresenta uma notável flexibilidade no uso de combustível em resposta à privação de energia (DE LANGE *et al.*, 2006). É quantitativamente o maior órgão do corpo, contribuindo com 30 a 40% da taxa metabólica de repouso em adultos (DE LANGE *et al.*, 2006). Nele, acontece a oxidação de ácidos graxos e glicose (responsável por 80% da captação de glicose estimulada pela insulina) (DE LANGE *et al.*, 2006). Um aspecto importante da plasticidade do músculo esquelético é a especificidade com que ele se adapta a um determinado estímulo com modificações estruturais, bioquímicas e funcionais (FLÜCK e HOPPELER, 2003).

Dois tipos principais de fibras são reconhecidos no músculo esquelético (PETTE e STARON, 1990) (PETTE e STARON, 1990; RADÁK 2008). As fibras do tipo I, são de contração lenta, apresentam alta capacidade de sintetizar ATP, possuem alta densidade mitocondrial e utilizam principalmente ácidos graxos como combustível (PETTE e STARON, 1990; FLÜCK e HOPPELER, 2003; VALBERG, 2008). Enquanto, as fibras do tipo II, são de contração rápida, seu conteúdo mitocondrial é reduzido e utilizam a glicose como fonte de energia (PETTE e STARON, 1990; VALBERG, 2008). As fibras do tipo II são classificadas em tipo IIa, que possuem uma mistura de propriedades glicolíticas e oxidativas, e tipo IIb, que são exclusivamente glicolíticas (PETTE e STARON, 1990; SCHIAFFINO e REGGIANI, 1994; FLÜCK e HOPPELER, 2003; PUNKT, NAUPERT e ASMUSSEN, 2004). Essas características histoquímicas podem ser encontradas no músculo EDL, que está constituído principalmente por fibras do tipo IIa e tipo IIb (PETTE e STARON, 1990). Enquanto, o músculo sóleo está constituído apenas por fibras do tipo I e tipo IIa (SCHIAFFINO e REGGIANI, 1994; DA SILVA ARAGÃO *et al.*, 2014).

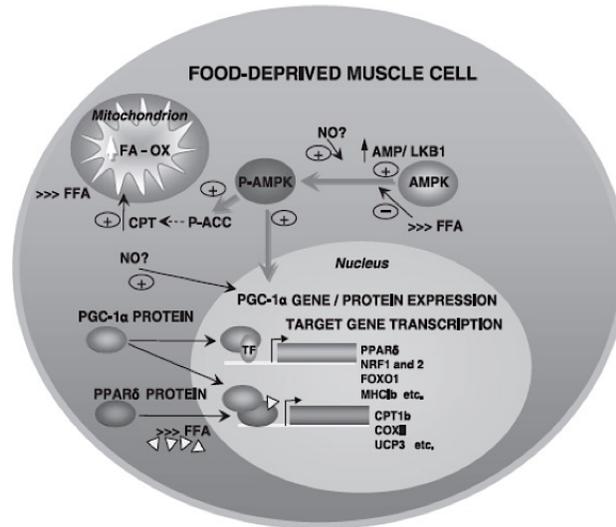
Devido à sua alta capacidade oxidativa, o músculo sóleo tende a usar ácidos graxos não esterificados (AGNE) como substratos energéticos, enquanto o músculo extensor longo dos dedos (EDL) tem taxas basais muito mais altas de glicólise e gliconeogênese (NEUMANN-HAEFELIN *et al.*, 2004). Além disso, esses dois músculos usam mecanismos diferentes para lidar com concentrações elevadas de AGNE induzidas pelo jejum (NEUMANN-HAEFELIN *et al.*, 2004). O músculo sóleo gasta o

excesso de AGNE por oxidação, enquanto o músculo EDL neutraliza AGNE por reesterificação (NEUMANN-HAEFELIN *et al.*, 2004; DA SILVA ARAGÃO *et al.*, 2014).

Tem sido observado, no músculo esquelético de pacientes obesos e resistentes à insulina, aumento da proporção de fibras musculares do tipo II (glicolíticas), menor capacidade das enzimas oxidativas e aumento do conteúdo de malonil-CoA (KELLEY *et al.*, 1999). No músculo esquelético de ratos obesos, também tem sido observado aumentado no conteúdo de malonil-CoA, um potente inibidor alostérico da CPT-1 (RUDERMAN *et al.*, 1997; SAHA *et al.*, 1997). Defeitos na atividade da CPT-1 estão associados ao acúmulo de lipídios no músculo esquelético (KELLEY *et al.*, 1999).

Para metabolizar ácidos graxos, o músculo esquelético precisa ativar vias complexas de transcrição, tradução e fosforilação (DE LANGE *et al.*, 2006). O aumento da relação AMP/ATP celular, induzida pela privação de alimentos, resulta na ativação com consequente fosforilação da AMPK. Uma vez fosforilada, a AMPK estimula 1) a captação mitocondrial de AGL para oxidação como fonte de energia, pela fosforilação da acetil-CoA carboxilase (ACC), ativando indiretamente o sistema CPT; e 2) a transcrição do coativador-1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ), que por sua vez induz a transcrição de vários fatores, incluindo o receptor delta ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR $\delta$ ). O aumento nuclear de PGC-1 $\alpha$  e PPAR $\delta$  induz a transcrição de seus genes-alvo que são responsáveis por alterações estruturais/metabólicas manifestadas após a privação alimentar (Figura 4) (DE LANGE *et al.*, 2006; DE LANGE *et al.*, 2007; MUOIO, 2014; SMITH *et al.*, 2018).

Figura 4 - Fatores envolvidos nas alterações metabólicas no músculo esquelético durante a privação alimentar.



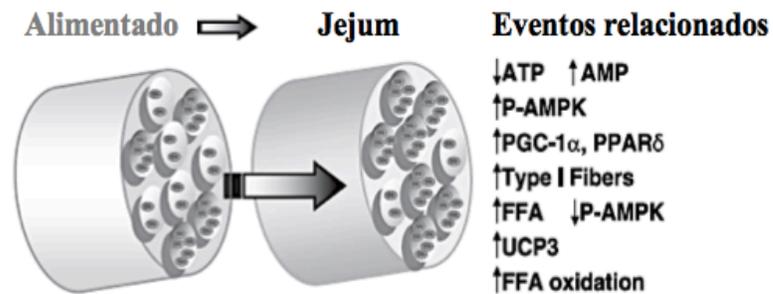
**Fonte:** DE LANGE et al., 2007.

AMPK: proteína quinase ativada por AMP; CPT: carnitina palmitoil transferase; FFA: ácidos graxos livres; LKB1: NO: óxido nítrico; PGC-1 $\alpha$ : coativador-1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma; PPAR $\delta$ : receptor delta ativado por proliferador de peroxissoma.

Como mencionado anteriormente, PGC-1 $\alpha$  é um coativador de PPAR $\delta$ , este último apresenta alta expressão em miofibrilas oxidativas em lugar de glicolíticas (WANG *et al.*, 2004), levando à sugestão de que este receptor pode estar envolvido na promoção da utilização de ácidos graxos como combustível (DE LANGE *et al.*, 2007). Experimentos com camundongos transgênicos têm mostrado que o PGC-1 $\alpha$  e o PPAR $\delta$  foram capazes de induzir a transição (*switch*) das fibras musculares do tipo II (glicolíticas) para oxidativas (tipo I) (LIN *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2004). Durante a privação de alimentos, tem sido observado regulação positiva do mRNA e expressão proteica nuclear de PGC-1 $\alpha$ , que, por sua vez, induz aumento acentuado nos níveis de mRNA e da expressão proteica da cadeia pesada de miosina Ib (MHC1b), indicativo da formação de fibras do tipo I (DE LANGE *et al.*, 2006). Outro fator que se encontra expresso no músculo esquelético durante o jejum é a proteína desacopladora 3 (UCP3) (BÉZAIRE *et al.*, 2001; JIMENEZ *et al.*, 2002; SAMEC *et al.*, 2002; TUNSTALL *et al.*, 2002; MORENO *et al.*, 2003; BLAYLOCK *et al.*, 2004; FRIER *et al.*, 2011; BAZHAN *et al.*, 2019). A mesma que desempenha um papel na promoção da oxidação de ácidos graxos (BEZAIRE *et al.*, 2005; MACLELLAN *et al.*, 2005) ou na translocação de ácidos

graxos peroxidados (GOGLIA e SKULACHEV, 2003). Na Figura 5. estão resumidos os principais eventos metabólicos que acontecem no músculo esquelético após a privação alimentar.

Figura 5 - Eventos metabólicos que ocorrem no músculo esquelético após a privação alimentar.

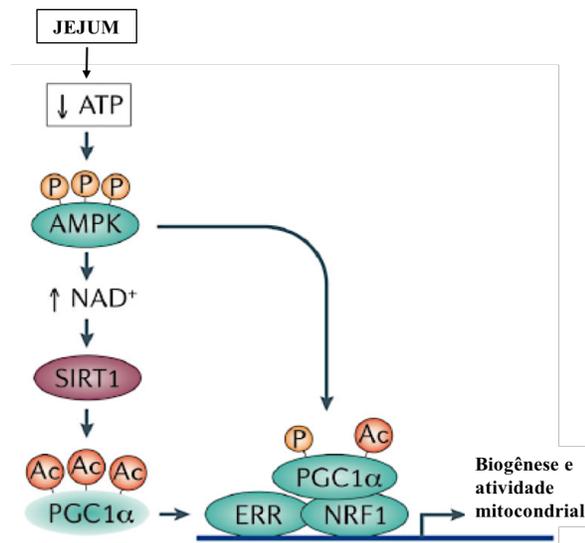


Fonte: DE LANGE et al., 2007

Por outro lado, tem sido estudado o papel das sirtuínas (SIRT<sub>s</sub>) nos mecanismos moleculares que regulam o metabolismo (CHANG e GUARENTE, 2014) (CHANG e GUARENTE, 2014; TANG 2016; GREEN, 2021). As SIRT<sub>s</sub> são uma família de desacetilases dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD<sup>+</sup>) (CHEN et al., 2020). São reconhecidos sete tipos de sirtuínas (SIRT1-7) (CHEN et al., 2020; JIAO e GONG, 2020), a SIRT1e SIRT3 são as mais relacionadas com a mediação da flexibilidade metabólica (HOUTKOOPE, PIRINEN e AUWERX, 2012; SMITH *et al.*, 2018). A SIRT1 é predominantemente encontrada no núcleo, embora também possa ser encontrada no citosol (HOUTKOOPE, PIRINEN e AUWERX, 2012) desempenha papel importante na modulação de uma ampla gama de processos fisiológicos, incluindo apoptose, reparo de DNA, metabolismo, homeostase mitocondrial e estresse (CHEN *et al.*, 2020; JIAO e GONG, 2020). A SIRT3, localizada na matriz mitocondrial, modula o metabolismo oxidativo no músculo esquelético (CHANG e GUARENTE, 2014) assim como no fígado (HIRSCHEY *et al.*, 2010) e tem como alvo enzimas que estão envolvidas na utilização de ácidos graxos (HIRSCHEY *et al.*, 2010; HOUTKOOPE, PIRINEN e AUWERX, 2012; CHANG e GUARENTE, 2014; SMITH *et al.*, 2018).

As SIRT1 e SIRT3 podem ser ativadas durante o jejum (HIRSCHEY *et al.*, 2010; HOUTKOOOPER, PIRINEN e AUWERX, 2012; CHANG e GUARENTE, 2014) através da sinalização de certas vias. Inicialmente, a AMPK, que é um sensor de energia celular, é ativada pela depleção do ATP durante o jejum. A AMPK ativada fosforila diretamente PGC-1 $\alpha$  e estimula indiretamente SIRT1 ao aumentar os níveis celulares de NAD<sup>+</sup>. Uma vez ativada, a SIRT1 desacetila a PGC-1 $\alpha$ , aumentando sua expressão (HOUTKOOOPER, PIRINEN e AUWERX, 2012). Por sua vez, a PGC-1 $\alpha$  estimulará a transcrição de genes relacionados com a biogênese e atividade mitocondrial (Figura 6) (CHANG e GUARENTE, 2014). No estudo de Heilbronn *et al.* (2005), foi observada a expressão positiva da SIRT1, no músculo esquelético de humanos submetidos a jejum prolongado, contudo, sem alterações na expressão de genes envolvidos no transporte/oxidação de ácidos graxos ou biogênese mitocondrial.

Figura 6 - Papel das sirtuínas na regulação de vias envolvidas no metabolismo.



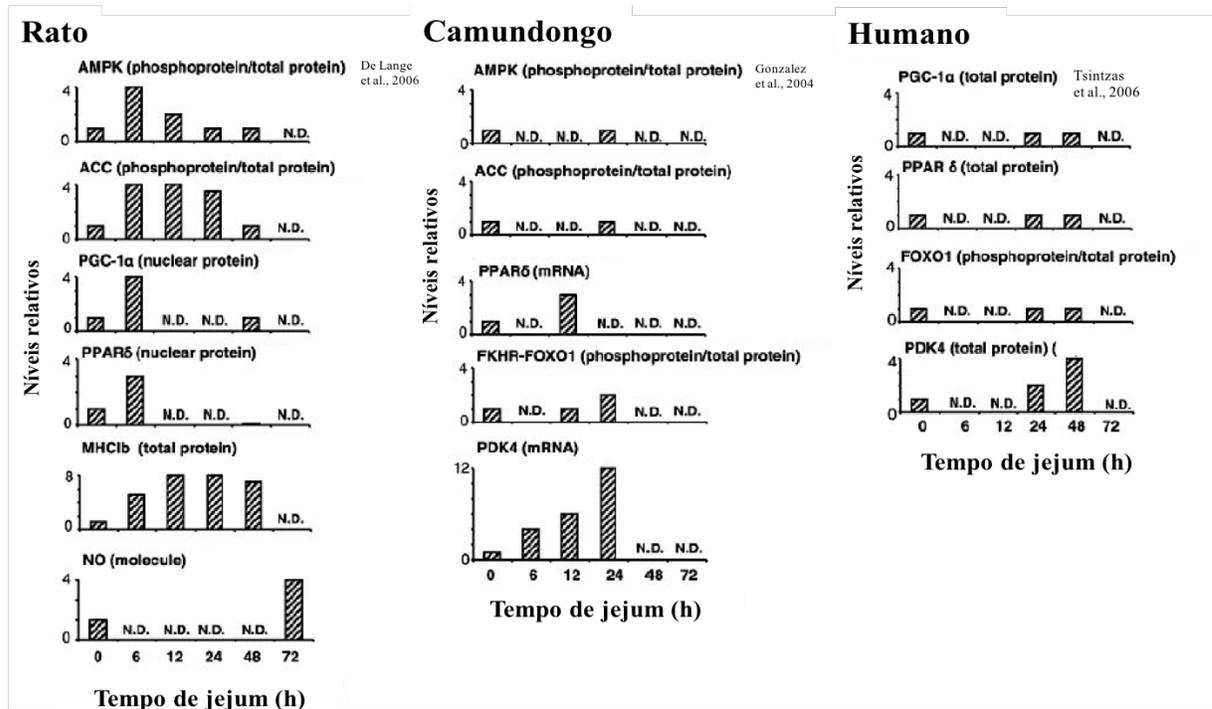
**Fonte:** Adaptado de HOUTKOOOPER, PIRINEN E AUWERX 2012.

AMPK: quinase ativada por AMP; ERR: receptor relacionado ao estrogênio; NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleotídeo; NRF1: fator respiratório nuclear 1; PGC-1 $\alpha$ : coativador-1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma; SIRT1: sirtuína 1.

Estudos de curso de tempo têm mostrado que, de acordo à duração do jejum, a espécie e o órgão alvo, as alterações transcricionais podem estar presentes ou não (GONZALEZ *et al.*, 2004; DE LANGE *et al.*, 2006; DE LANGE *et al.*, 2007). No músculo gastrocnêmio de ratos submetidos a 6, 12, 24 e 48 h de jejum foi observado aumento

nos níveis de mRNA e na expressão proteica do MHC1b, em todos os tempos de jejum avaliados (DE LANGE *et al.*, 2006). Os níveis de PPAR $\delta$  (receptor nuclear) apresentaram-se aumentados com 6 e 48 h de jejum e o PGC-1 $\alpha$  apenas com 6 h de jejum (DE LANGE *et al.*, 2006). A fosforilação/atividade de AMPK foi muito rápida, tendo seu maior aumento com 6 h de jejum (DE LANGE *et al.*, 2006). No entanto, no músculo gastrocnêmio de camundongos com jejum de 24 h nenhuma alteração na fosforilação/atividade de AMPK foi observada (GONZALEZ *et al.*, 2004). Por outro lado, a transcrição de genes envolvidos no metabolismo lipídico e oxidativo (CPT-1 e UCP3) foi aumentada no músculo gastrocnêmio de camundongos expostos a 16 h de jejum (LONG *et al.*, 2005). Em humanos, após jejum de 24 e 48 h, não foi possível observar aumento da expressão de fatores de transcrição e genes envolvidos no metabolismo de lipídeos (Figura 7) (TSINTZAS *et al.*, 2006).

Figura 7 - Tempo de expressão/fosforilação de vários fatores importantes envolvidos na resposta adaptativa primária do músculo esquelético ao jejum.



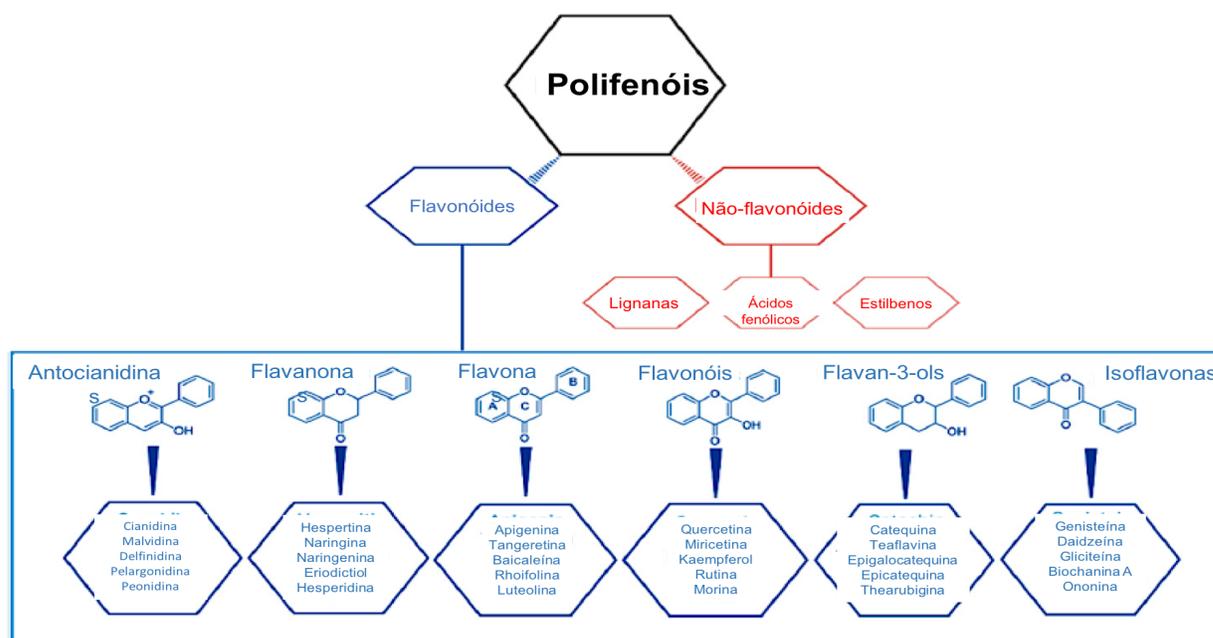
Fonte: DE LANGE *et al.*, 2007.

ACC: acetil-CoA carboxilase; AMPK: quinase ativada por AMP 5'; MHC1b: cadeia pesada de miosina Ib; N.D.: não determinado em nenhuma das espécies investigadas; PGC-1 $\alpha$ : coativador-1 alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma; PDK4: piruvato desidrogenase quinase 4; PPAR $\delta$ : receptor delta ativado por proliferador de peroxissoma.

## 2.5 POLIFENÓIS

Os polifenóis são conhecidos principalmente por seu amplo espectro de propriedades biológicas, que se devem basicamente à sua estrutura molecular (DZIAŁO *et al.*, 2016). Estruturalmente, possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados, e são classificados como flavonoides e não-flavonoides (DEL RIO *et al.*, 2013; DZIAŁO *et al.*, 2016) (Figura 8). Os flavonoides são um dos grupos de polifenóis mais estudados, estruturalmente possuem um esqueleto com 15 átomos de carbono (C15) com dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três carbonos (C6-C3-C6) (DEL RIO *et al.*, 2013; DZIAŁO *et al.*, 2016; FRAGA *et al.*, 2019). As principais subclasses de flavonoides são: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavan-3-ols, isoflavonas e antocianidinas (MANACH *et al.*, 2004; DEL RIO *et al.*, 2013; DZIAŁO *et al.*, 2016; FRAGA *et al.*, 2019) (Figura 2). Os compostos não-flavonoides, por vez, são subdivididos em: lignanas, ácidos fenólicos e estilbenos (DZIAŁO *et al.*, 2016; FRAGA *et al.*, 2019) (Figura 8).

Figura 8 - Classificação e estrutura química dos polifenóis e dos principais flavonoides.



Fonte: GOUVEIA *et al.*, 2022.

Nas plantas, os flavonoides são armazenados como glicosídeos e agliconas, o que pode influenciar posteriormente sua biodisponibilidade (DEL RIO *et al.*, 2013; DZIAŁO *et al.*, 2016; FRAGA *et al.*, 2019). Na estrutura química dos flavonoides, pode-se observar que o principal sítio de glicosilação encontra-se na posição 3' e, menos frequentemente, na posição 7', sendo que a glicose é o açúcar mais comumente ligado a este sítio (DEL RIO *et al.*, 2013). Porém, outros açúcares, como a galactose, ramnose, arabinose e xilose, também podem estar ligados (MANACH *et al.*, 2004). Como regra geral, os flavonoides ligados a este tipo de açúcares são absorvidos lentamente e com menos eficiência do que agliconas e quando ligados à glicose (MANACH *et al.*, 2004).

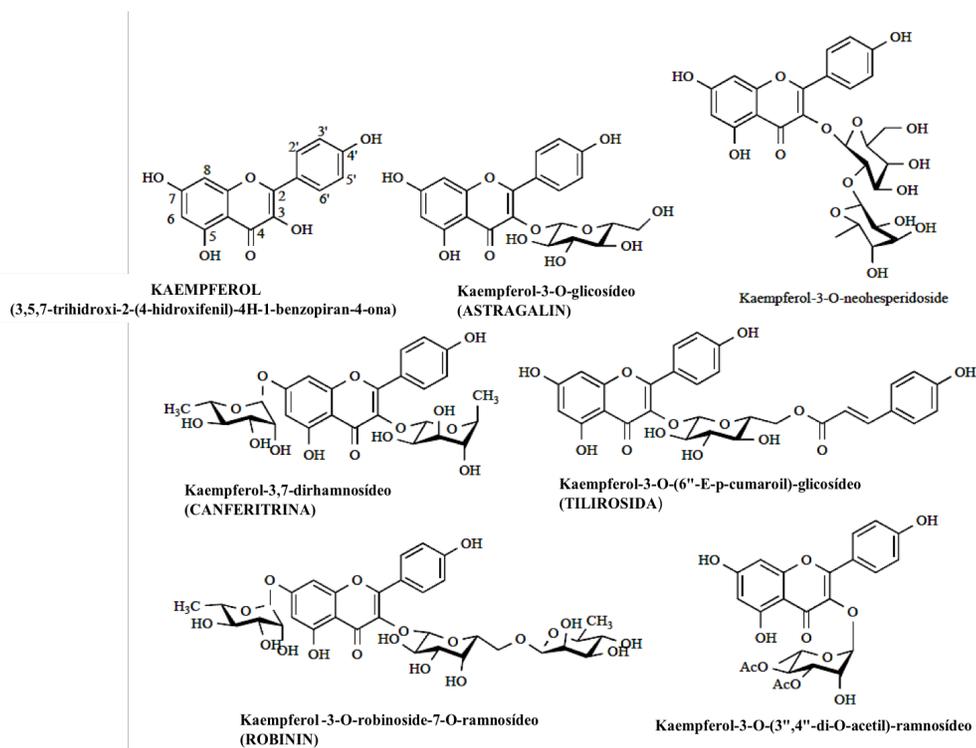
Os flavonóis são a subclasse de flavonoides mais encontrados nos alimentos, e os principais representantes são: quercetina, kaempferol, isorhamnetina e miricetina (DEL RIO *et al.*, 2013). Esses flavonóis se acumulam nos tecidos externos e aéreos (pele e folhas) porque sua biossíntese é estimulada pela luz solar e geralmente são encontrados como glicosídeos em concentrações de 15 a 30 mg/kg de peso fresco de alimento (MANACH *et al.*, 2004). A quercetina e o kaempferol possuem aproximadamente 279 e 347 combinações glicosídicas, respectivamente (TSAO, 2010; ARFAOUI, 2021).

## 2.5.1 Kaempferol

### 2.5.1.1 Características químicas do kaempferol

Em relação às características químicas, o kaempferol é um pó amarelo de baixo peso molecular (PM: 286,2 g/mol), com ponto de fusão de 276-278°C, solúvel em etanol quente, éter alcalino, dimetilsulfóxido e pouco solúvel na água (REN *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2021). O kaempferol, assim como outros polifenóis, pode ser encontrado nas plantas e alimentos na forma de agliconas ou como glicosídeos. Na Figura 9 é apresentada a estrutura química do kaempferol e seus principais glicosídeos.

Figura 9 - Estrutura química do kaempferol e seus principais glicosídeos.

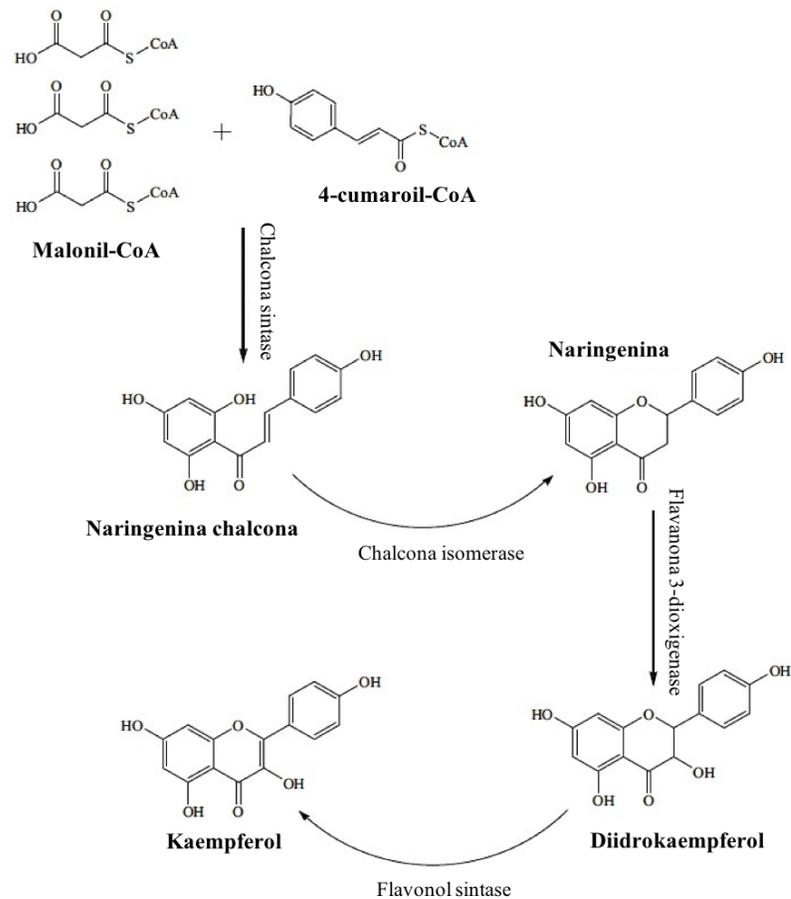


Fonte: CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2011

### 2.5.1.2 Biossíntese do kaempferol

O kaempferol é sintetizado através da condensação do 4-cumaroil-CoA com três moléculas do malonil-CoA sob a ação catalítica da chalcona sintase produzindo a naringenina chalcona (DEVI *et al.*, 2015). Subsequentemente, sob os efeitos catalíticos da chalcona isomerase, a naringenina chalcona é transformada em naringenina (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; DEVI *et al.*, 2015). Na etapa seguinte, um grupo hidroxila é adicionado à naringenina (na posição C3) para produzir o diidrokaempferol, sob a atividade da flavanona 3-dioxigenase (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; DEVI *et al.*, 2015). Finalmente, é formado o kaempferol (3,5,7-trihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-ona) pela introdução de uma ligação dupla na posição C2-C3 no esqueleto do diidrokaempferol, sob a atividade da flavonol sintase (Figura 10) (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; DEVI *et al.*, 2015; REN *et al.*, 2019).

Figura 10 - Biossíntese do kaempferol.



Fonte: DEVI et al., 2015

### 2.5.1.3 Principais fontes alimentares do kaempferol

Encontra-se presente em vários vegetais comuns, frutas e em diferentes plantas medicinais como: alho-poró, cebola, cebolinha, rabanete, brócolis, couve de bruxelas, repolho verde, couve, rúcula, espinafre, alface, alcaparras, pepino, tomates, abóbora, batata-doce, feijão, fava, toranja, morango, maçã, pêsego, amoras, framboesa, punica granatum (romã), cranberries, goji berries, equisetum spp (cavalinha), ginkgo biloba, centella asiática e rosmarinus officinalis (alecrim) (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011). A quantidade de kaempferol em 100 gramas de alimento fresco mostra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantidade de kaempferol em diferentes fontes alimentares.

Fonte	Quantidade de kaempferol
Couve, crua	26,74 mg/100g
Folhas de acelga vermelha, cruas	9,20 mg/100g
Cebolinha, fresca	7,90 mg/100g
Espinafre, cru	7,86 mg/100g
Folhas de acelga branca, cruas	5,80 mg/100g
Brócolis, cru	5,65 mg/100g
Feijão branco, inteiro, cru	3,05 mg/100g
Mirtilo, cru	1,48 mg/100g
Groselha preta, crua	1,05 mg/100g
Couves de Bruxelas, cruas	0,95 mg/100g
Feijão preto, inteiro, cru	0,88 mg/100g
Morango, cru	0,62 mg/100g
Repolho branco, cru	0,34 mg/100g
Toranja	0,27 mg/100g
Couve-flor, crua	0,21 mg/100g
Laranja	0,10 mg/100g
Amora, crua	0,09 mg/100g
Tomate, inteiro, cru	0,04 mg/100g
Tomate cereja, inteiro, cru	0,03 mg/100g

**Fonte:** Phenol-Explorer (banco de dados sobre o conteúdo de polifenóis em alimentos, versão 3.6).

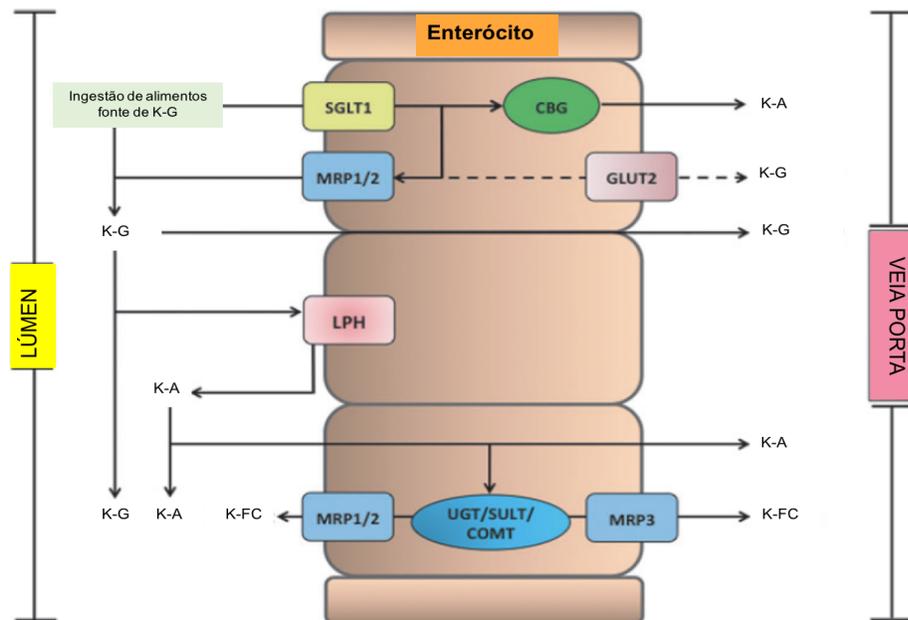
#### 2.5.1.4 Farmacocinética do kaempferol

A biodisponibilidade do kaempferol assim como de outros compostos bioativos após a ingestão dietética tem sido um tópico de crescente pesquisa nos últimos anos (MANACH *et al.*, 2004; CROZIER, DEL RIO e CLIFFORD, 2010; CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; DEL RIO *et al.*, 2013; FRAGA *et al.*, 2019). Assim como outros flavonoides, o kaempferol é absorvido principalmente no intestino delgado (MANACH *et al.*, 2004; CROZIER, DEL RIO e CLIFFORD, 2010; CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; DEL RIO *et al.*, 2013; FRAGA *et al.*, 2019). A lipofilicidade do kaempferol facilita sua absorção por difusão simples, mas evidências sugerem que ele também pode ser absorvido no intestino delgado por difusão facilitada ou transporte ativo (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2021).

Normalmente, a absorção do kaempferol na forma de glicosídeo no intestino delgado está associada à sua hidrólise, através de duas vias: a primeira por meio da liberação do kaempferol na forma de aglicona como resultado da ação da lactase floridzina hidrolase (LPH) na borda em escova das células epiteliais do intestino

delgado. Subsequentemente, com a entrada da aglicona liberada no enterócito por difusão passiva (CROZIER, DEL RIO e CLIFFORD, 2010; DEL RIO *et al.*, 2013). A segunda via hidrolítica está associada à ação da enzima  $\beta$ -glicosidase citosólica (CBG), mas para que isso aconteça, o kaempferol, na forma de glicosídeo, deve ser transportado para dentro do enterócito pelo transportador de glicose dependente de sódio 1 (SGLT1) (CROZIER, DEL RIO e CLIFFORD 2010; DEL RIO *et al.*, 2013). Embora isso sugira que a absorção do kaempferol na forma de glicosídeo precisa da hidrólise prévia para agliconas absorvíveis, estudos mostram que os glicosídeos podem ser absorvidos sem hidrólise (Figura 11) (GEE e JOHNSON, 2001; CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011).

Figura 11 - Mecanismos de absorção e metabolismo do kaempferol no intestino delgado.



**Fonte:** Adaptado de DEL RIO *et al.*, 2013.

K-A: kaempferol como aglicona; K-G: kaempferol como glicosídeo; K-FC: formas conjugadas de kaempferol/metabólitos; LPH: lactase floridzina hidrolase; CBG:  $\beta$ -glicosidase citosólica; SGLT1: transportador de glicose dependente de sódio 1; MRP: proteína de resistência a múltiplas drogas; GLUT2: transportador de glicose 2, UGT: uridina-5'-difosfato-glucuronosiltransferase; SULT: sulfotransferase; COMT: catecol-O-metiltransferase.

Antes da passagem para a corrente sanguínea, as agliconas sofrem algum grau de metabolismo de fase II, compondo as formas conjugadas do kaempferol: sulfato,

glicuronídeo e/ou metabólitos metilados através da respectiva ação das enzimas de conjugação intestinal como as sulfotransferases (SULTs), uridina-5'-difosfato glucuronosiltransferases (UGT) e catecol-O-metiltransferases (COMTs) (Figura 11) (CROZIER, DEL RIO e CLIFFORD, 2010; CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; DEL RIO *et al.*, 2013; FRAGA *et al.*, 2019). No entanto, parte dessas formas conjugadas do kaempferol, assim como o kaempferol na forma de glicosídeo antes de sua hidrólise enzimática, pode voltar para o lúmen do intestino delgado através do transportador de proteína de resistência a múltiplas drogas 1 e 2 (MRP1-2) (CROZIER, DEL RIO e CLIFFORD, 2010; DEL RIO *et al.*, 2013). Estudos mostram que o transportador de proteína de resistência a múltiplas drogas 3 (MRP3) e o transportador de glicose 2 (GLUT2), estão relacionados com o efluxo destes elementos através da membrana basolateral dos enterócitos em direção à veia porta (MANZANO e WILLIAMSON, 2010; DEL RIO *et al.*, 2013).

Após a absorção, uma vez na corrente sanguínea portal, o kaempferol atinge rapidamente o fígado, onde é extensamente metabolizado e pode ser submetido ao metabolismo de fase II com conversões adicionais, formando conjugados de metil, sulfato ou glicuronídeo (CROZIER, DEL RIO e CLIFFORD, 2010; CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; DEL RIO *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2021). No entanto, pela recirculação entero-hepática, estes podem voltar ao intestino delgado através da excreção biliar (Figura 12) (CROZIER, DEL RIO e CLIFFORD, 2010; DEL RIO *et al.*, 2013). Estudos mostram que o kaempferol-3-glicuronídeo é o principal metabólito do kaempferol encontrado no plasma (DUPONT *et al.*, 2004; ZABELA *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2021) e na urina (WANG, YAO e ZENG, 2003; DUPONT *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2021).

Por outro lado, os glicosídeos de kaempferol que são resistentes à ação das enzimas LPH/CBG e não conseguiram ser absorvidos no intestino delgado, passam para o cólon, onde são metabolizados pela microflora (Figura 12) (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; DEL RIO *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2021). As bactérias colônicas podem hidrolisar os glicosídeos de kaempferol em agliconas e quebrar o anel C3 das agliconas para formar compostos fenólicos simples e hidroxicinamatos, como o ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPAA), floroglucinol e 4-metilfenol, que podem ser

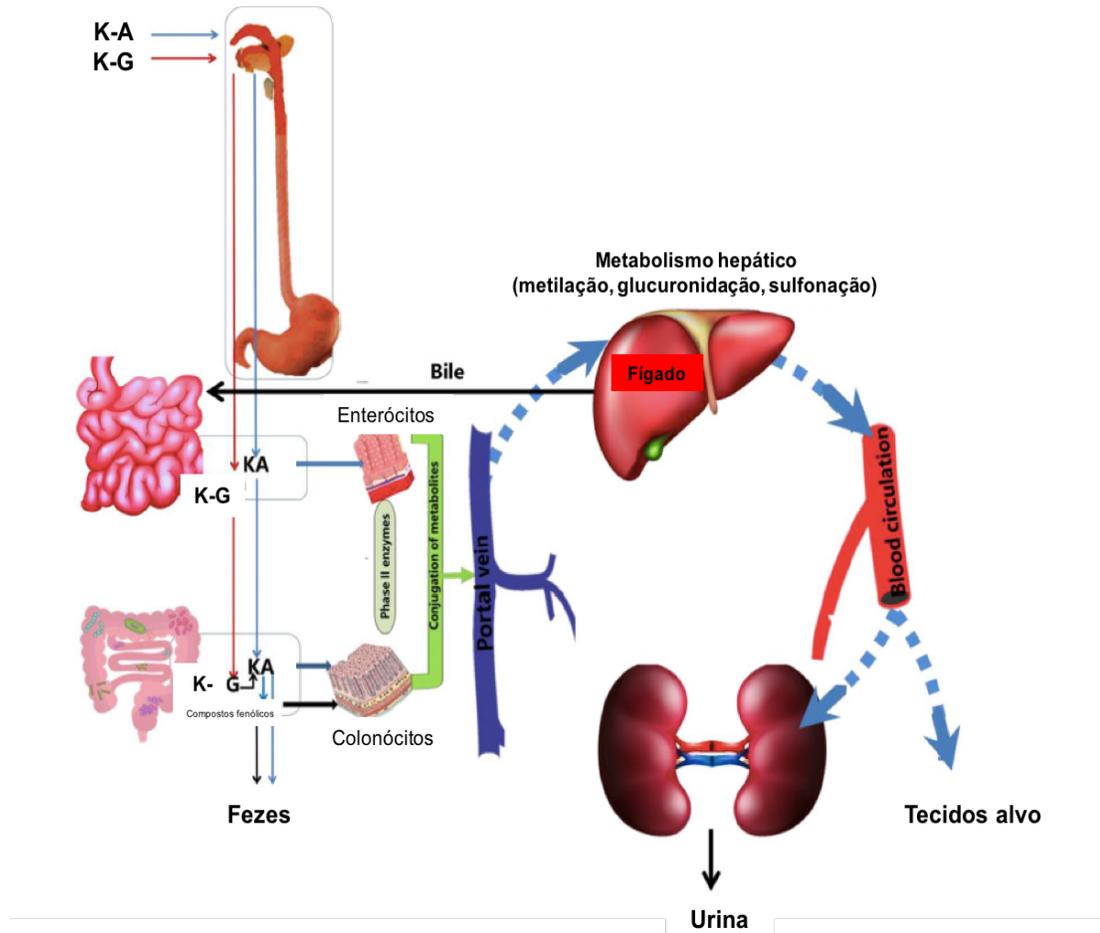
absorvidos ou excretados nas fezes (Figura 6) (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2021).

O 4-HPAA é considerado o principal metabólito intestinal do kaempferol (VISSIENNON *et al.*, 2012; MORADI-AFRAPOLI *et al.*, 2016; ZABELA *et al.*, 2016). No estudo de VISSIENNON *et al.* (2012), foi observado que os efeitos fisiológicos do 4-HPAA somente foram detectados após a administração oral do kaempferol e não foram observados quando administrado pela via intraperitoneal. Corroborando a hipótese de que o kaempferol requer a ação das bactérias colônicas para se transformar em seu metabólito intestinal ativo, o ácido 4-hidroxifenilacético.

A administração de substâncias na cavidade peritoneal é uma técnica comumente usada em roedores de laboratório, mas raramente é usada em mamíferos maiores e humanos (TURNER *et al.*, 2011). Embora a administração intraperitoneal seja considerada uma via de administração parenteral, a farmacocinética das substâncias administradas por via intraperitoneal é mais semelhante àquela observada após a administração oral, pois a principal via de absorção é nos vasos mesentéricos, que drenam para a veia porta e passam pelo fígado. Portanto, as substâncias administradas por via intraperitoneal podem sofrer metabolismo hepático antes de atingir a circulação sistêmica (LUKAS, BRINDLE e GREENGARD, 1971; TURNER *et al.*, 2011).

Finalmente, na circulação sistêmica podem ser encontradas as formas conjugadas de kaempferol, alguns compostos fenólicos produzidos pela microflora do cólon, o kaempferol na forma de aglicona e alguns glicosídeos de kaempferol, que chegarão até os tecidos-alvo e posteriormente serão excretados na urina (Figura 12) (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011). Têm sido encontradas diferentes porcentagens de excreção de kaempferol na urina. No estudo de Vries e colaboradores (1998), a porcentagem de kaempferol excretada na urina foi de 2,5% após 24h da ingestão de 1600 ml/dia de chá preto (27 mg de kaempferol/dia). Em outro estudo, a ingestão de 150 g de endívia (8,65 mg de kaempferol/dia) levou a uma excreção urinária de 1,9% após 24 h (DUPONT *et al.*, 2004).

Figura 12 - Absorção, metabolismo e excreção do kaempferol.



Fonte: YANG et al., 2021. K-A: kaempferol como aglicona; K-G: kaempferol como glicosídeo.

### 2.5.1.5 Principais atividades biológicas do kaempferol

Estudos sugerem que o kaempferol exibe múltiplas atividades biológicas, incluindo: antioxidante (BARVE *et al.*, 2009), anti-inflamatória (YANG *et al.*, 2021), antidiabética e de controle da glicemia (ZANG *et al.* 2015; GAN *et al.* 2017) e neuroprotetora (LI e PU, 2011; YANG *et al.*, 2019).

#### 2.5.1.5.1 Atividade antioxidante do kaempferol

Em relação a sua atividade antioxidante, o kaempferol tem mostrado que graças a sua estrutura química tem a capacidade de sequestrar e/ou remover espécies reativas

de oxigênio (ERO) (HIBATALLAH, CARDUNER E POELMAN 1999; CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011). As ERO são compostos químicos resultantes da ativação ou da redução do oxigênio molecular ou derivados dos produtos da redução (YANG, CHENG e SHI 2019). As principais ERO são: o ânion radical superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o oxigênio singlete e o radical hidroxila (OH) (YANG, CHENG e SHI 2019). A capacidade do kaempferol de diminuir os níveis do radical superóxido pode desempenhar um papel importante em sua atividade antioxidante, pois a formação do radical superóxido é necessária para a produção da maioria das espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio envolvidas no estresse oxidativo (CALDERÓN-MONTAÑO *et al.*, 2011). O kaempferol também tem demonstrado exercer efeitos antioxidantes por meio de outros mecanismos de ação, primeiro através da inibição da atividade de enzimas que geram ERO, como a enzima xantina oxidase (NAGAO, SEKI E KOBAYASHI 1999; WANG *et al.*, 2006; ÖZYÜREK *et al.*, 2009). Pela redução da formação do radical OH através da reação de quelatação de íons de ferro e cobre (MIRA *et al.*, 2002) e pelo aumento da expressão ou atividade de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e heme oxigenase-1 (DORONICHEVA, YASUI e SAKURAI 2007).

#### 2.5.1.5.2 Atividade anti-inflamatória do kaempferol

A atividade anti-inflamatória do kaempferol pode ser mediada por vários mecanismos de ação (YANG *et al.*, 2021). A ativação de o fator nuclear kappa B (NF-kB) aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e enzimas (por exemplo, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL8, COX-2, iNOS) e vários trabalhos mostraram que o kaempferol inibe a atividade do NF-kB (WANG *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010; GARCÍA-MEDIAVILLA *et al.*, 2007). As enzimas ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) são conhecidas por desempenhar papéis importantes na inflamação, participando da síntese de eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos) e na produção de espécies reativas. Alguns trabalhos mostraram que o kaempferol pode inibir COX-2 (GARCÍA-MEDIAVILLA *et al.*, 2007; MAHAT *et al.*, 2010), LOX (DENG *et al.*, 2008) e iNOS

(OLSZANECKI *et al.*, 2002; GARCÍA-MEDIAVILLA *et al.*, 2007). As ERO também são conhecidas por participar do processo inflamatório (YANG, CHENG e SHI 2019) e, como mostrado na seção anterior, o kaempferol pode reduzir os níveis celulares de ERO.

#### 2.5.1.5.3 Atividade antidiabética do kaempferol

Diabetes mellitus é uma doença metabólica cuja principal característica é a hiperglicemia crônica (PETERSMANN *et al.*, 2019). A causa é uma secreção de insulina alterada ou um efeito de insulina alterado ou geralmente ambos (PETERSMANN *et al.*, 2019). Estudos mostram que o kaempferol apresenta grande efeito no tratamento do diabetes, e seu mecanismo molecular pode estar relacionado à ativação da proteína AMPK (SHENG *et al.*, 2022). A ativação da AMPK pode inibir a lipogênese, estimular a oxidação de ácidos graxos, a produção de glicose e melhorar a sensibilidade à insulina e a tolerância à glicose (HARDIE 2013). Além disso, o kaempferol pode inibir o acúmulo de lipídios intracelulares por meio da ativação da via de sinalização AMPK (GAN *et al.* 2017). O tratamento com kaempferol em camundongos alimentados com dieta rica em gordura saturada resultou em uma diminuição significativa no peso corporal, glicemia de jejum e níveis séricos de hemoglobina glicada (HbA1c) (ZANG *et al.* 2015). O estudo de Qin *et al.* (2016) relatou que o kaempferol melhorou a sensibilidade à insulina e a outros distúrbios causados pela resistência à insulina em camundongos alimentados com dieta rica em gordura. O estudo de Alkhalidy *et al.* (2018) determinou que a ação antidiabética do kaempferol foi mediada pela inibição da gliconeogênese hepática e pela promoção do metabolismo da glicose no músculo esquelético. Desta forma, o tratamento com kaempferol pode restaurar os níveis de glicose e insulina no plasma próximos ao normal (ALKHALIDY *et al.*, 2018).

#### 2.5.1.5.4 Atividade neuroprotetora do kaempferol

Estudos mostram que o efeito neuroprotetor do kaempferol está relacionado com sua ação antioxidante (LI e PU 2011). Sabe-se que o desequilíbrio na produção de antioxidantes endógenos como do superóxido dismutase (SOD) e da glutathiona

peroxidase (GSH-PX) resulta em apoptose de neurônios e auto-oxidação da dopamina (JENNER e OLANOW 1996). A dopamina é o principal neurotransmissor envolvido nas funções motoras e sua depleção impacta diretamente nos movimentos físicos (SOWEL, OWEN, BUTTERFIELD 2009). Li e Pu (2011) observaram melhora na coordenação motora, aumento na atividade locomotora espontânea e aumento nos níveis de SOD e GSH-PX em modelo animal de doença de Parkinson, após a administração oral de 50 e 100 mg/kg de kaempferol. Além disso, o kaempferol foi capaz de aumentar os níveis de dopamina e de seu metabólito o ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) no corpo estriado (LI e PU 2011). Sugerindo que o aumento do conteúdo de dopamina no corpo estriado pode ter restaurado as mudanças na atividade locomotora (LI e PU 2011). Contudo, o kaempferol não afetou a atividade da monoamina-B (MAO-B), sugerindo, portanto, que os efeitos neuroprotetores do kaempferol não foram devidos à inibição da MAO-B e sim pela capacidade antioxidante do kaempferol (LI e PU 2011). Outro estudo demonstrou que o kaempferol foi capaz de melhorar a lesão de neurônios dopaminérgicos através da inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (YANG *et al.*, 2019). Han *et al.* (2019) observaram, em camundongos, que o kaempferol foi capaz de inibir a neurodegeneração através da inativação do NLRP3, que é constituído pelo complexo proteico NLRP3-PYCARD-CASP1 responsável por ativar a caspase-1 e IL-1 $\beta$ , levando assim a uma resposta inflamatória.

## 2.5.2 Resveratrol

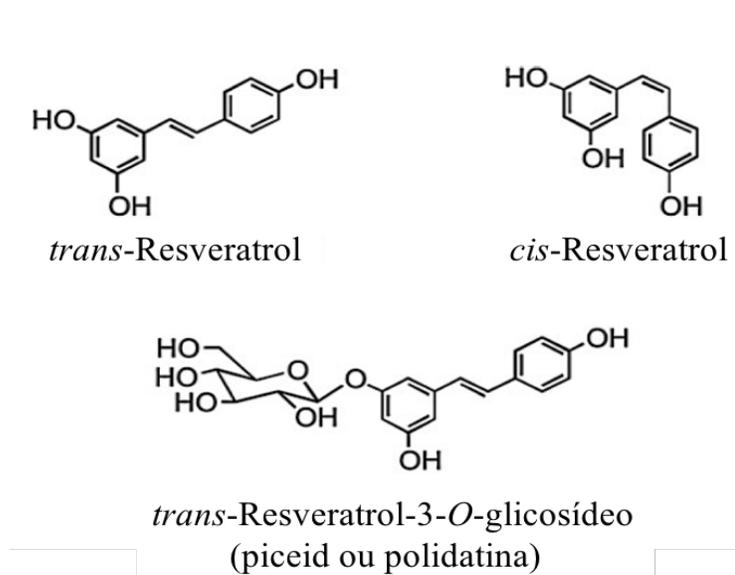
Um dos estilbenos mais estudados é o resveratrol (DEL RIO *et al.*, 2013). Os estilbenos possuem uma estrutura química C6–C2–C6 e são produzidos pelas plantas em resposta a doenças, lesões e estresse (DEL RIO *et al.*, 2013).

### 2.5.2.1 Características químicas do resveratrol

O resveratrol pode ser encontrado na natureza sob a forma aglicosídica e glicosídica (NUNES *et al.*, 2018). Como aglicona, o resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) consiste em dois anéis fenólicos unidos por uma dupla ligação de metileno que gera dois isômeros *trans* e *cis* (FRANCIOSO *et al.*, 2014; LUCA *et al.*, 2020). O isômero

*trans* é biologicamente mais ativo e mais foto e termoestável que o isômero *cis* (Figura 13) (DEL RIO *et al.*, 2013; FRANCIOSO *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2018; LUCA *et al.*, 2020). O principal glicosídeo do *trans*-resveratrol é o *trans*-resveratrol-3-O-glicosídeo, conhecido como *piceid* ou *polidatina* (Figura 13) (DEL RIO *et al.*, 2013; BASHOLLI-SALIHU *et al.*, 2016). No entanto, apresenta menor bioatividade e biodisponibilidade em comparação com a forma aglicosídica do *trans*-resveratrol (SU *et al.*, 2013; BASHOLLI-SALIHU *et al.*, 2016) precisando de sua desglicosilação para se converter em aglicona de *trans*-resveratrol (BASHOLLI-SALIHU *et al.*, 2016). O resveratrol é solúvel em etanol, metanol ou isopropanol (FRANCIOSO *et al.*, 2014).

Figura 13 - Estrutura química do resveratrol *trans* e *cis*, e seu principal glicosídeo.



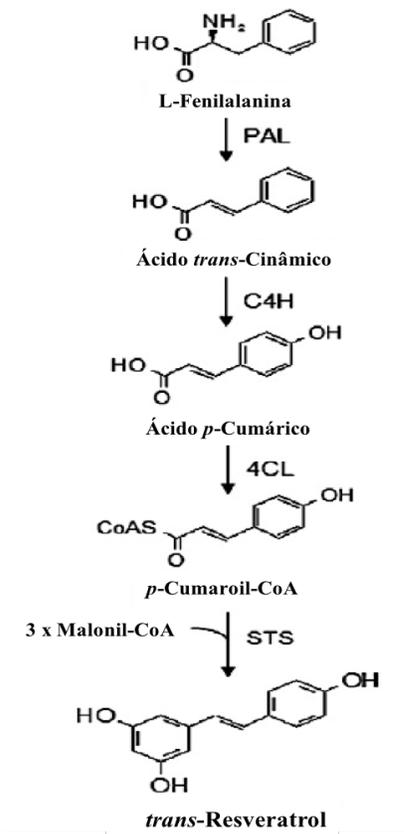
Fonte: DEL RIO *et al.*, 2013.

#### 2.5.2.2 Biossíntese do *trans*-resveratrol

Nas plantas, o resveratrol é sintetizado através da desaminação da L-fenilalanina pela ação da fenilalanina amônia-liase (PAL) formando o ácido *trans*-cinâmico (NUNES *et al.*, 2018). A cinamato-4-hidroxilase (C4H) catalisa a introdução de um grupo hidroxila produzindo o ácido *p*-cumárico, que é transformado para o *p*-cumaroil-CoA pela ação da enzima 4-cumarato-CoA ligase (4CL) (NUNES *et al.*, 2018). Finalmente, a estilbeno

sintase (STS) condensa as três moléculas de malonil-CoA e uma molécula de *p*-cumaroil-CoA para formar o *trans*-resveratrol (Figura 14) (PLANAS *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2018).

Figura 14 - Biossíntese do *trans*-resveratrol



**Fonte:** PLANAS *et al.*, 2012.

PAL: fenilalanina amônia-liase; C4H: cinamato-4-hidroxilase; 4CL: 4-cumarato-CoA ligase; STS: estilbeno sintase.

### 2.5.2.3 Principais fontes alimentares do resveratrol

O *trans*-resveratrol é encontrado em uma variedade de espécies de plantas (por exemplo, uvas, amendoim, knotweed japonês ou bambu mexicano (*Polygonum cuspidatum*) e várias espécies de frutos silvestres, como amoras, mirtilos e arándanos cranberries)) (Tabela 2) (PLANAS *et al.*, 2012; FRANCIOSO *et al.*, 2014; NUNES *et al.*, 2018; LUCA *et al.*, 2020). Em relação à ingestão diária de resveratrol, estudos relatam

valores que vão de 0,933 ug/dia a 4mg/dia (ZAMORA-ROS *et al.*, 2018; LUCA *et al.*, 2020).

Tabela 2 - Quantidade de resveratrol em diferentes fontes.

Fonte	Quantidade de resveratrol	
	Resveratrol (aglicona)	Resveratrol-3-O-glicosídeo (piceid/polidatina)
Vinho tinto de uva Muscadine	3,02 mg/100 mL	-
Lingonberry	3 mg/100 g	-
Arándanos, cranberries	1,92 mg/100 g	-
Groselha vermelha	1,57 mg/100 g	-
Mirtilo	0,67 mg/100 g	-
Morango	0,35 mg/100 g	-
Vinho de uva vermelha	0,27 mg/100 mL	0,62 mg/100 mL
Uvas pretas	0,15 mg/100 g	0,03 mg/100 mg
Vinho de uva rosé	0,12 mg/100 mL	-
Pistache	0,11 mg/100 g	-
Amendoim	0,08 g/100 g	-
Vinho de uva branca	0,04 mg/100 mL	0,25 mg/100 mL
Chocolate amargo	0,04 mg/100 g	0,10 mg/100 g
Manteiga de amendoim	0,04 mg/100 g	0,01 mg/100 g
Uvas verdes	0,02 mg/100 g	0,24 mg/100 mg

**Fonte:** Phenol-Explorer (banco de dados sobre o conteúdo de polifenóis em alimentos, versão 3.6).

#### 2.5.2.4 Farmacocinética do resveratrol

Os efeitos benéficos à saúde propostos para o *trans*-resveratrol são comprometidos por sua baixa biodisponibilidade oral (PLANAS *et al.*, 2012). No entanto, o chamado paradoxo do resveratrol (definido como baixa biodisponibilidade e alta bioatividade) ainda levanta sérias questões, pois os mecanismos responsáveis pelos efeitos observados ainda não foram totalmente esclarecidos (LUCA *et al.*, 2020). A baixa biodisponibilidade oral (JUAN *et al.*, 2002; WALLE, 2011) tem sido atribuída a vários fatores como à absorção intestinal incompleta, bem como ao extenso metabolismo e eliminação através de seus transportadores (PLANAS *et al.*, 2012).

No lúmen do intestino delgado o *trans*-resveratrol atravessa a membrana apical e basolateral do enterócito por difusão simples ou através de transportadores (PLANAS *et al.*, 2012, NUNES *et al.*, 2018). A forma aglicona do resveratrol é absorvida por difusão simples através da membrana apical, enquanto a forma glicosídica (piceid/polidatina) é ativamente transportada pelo transportador de glicose dependente de sódio 1 (SGLT1)

(NUNES et al., 2018), uma vez dentro do citosol, o glicosídeo de resveratrol é clivado em aglicona sob ação da glicosidase citosólica (CBG) (NUNES et al., 2018). Alternativamente, esse processo pode ocorrer no lúmen do intestino pela ação de  $\beta$ -glicosidases (BG) produzidas pela microflora intestinal (Figura 15) (BASHOLLI-SALIHU et al., 2016; NUNES et al., 2018).

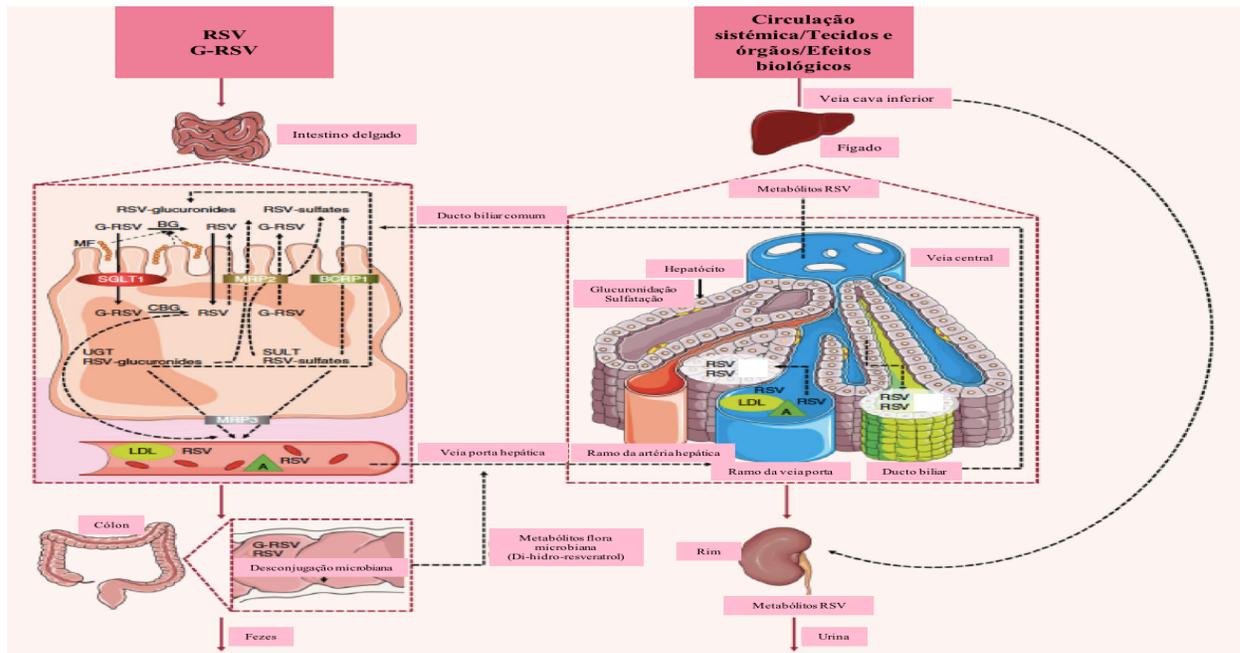
No enterócito, o resveratrol é rapidamente metabolizado em glicuronídeos de resveratrol e sulfatos de resveratrol pela ação das enzimas uridina-5'-difosfato-glucuronosiltransferase (UGT) e sulfotransferase (SULT), respectivamente (PLANAS et al., 2012). Esses metabólitos podem voltar ao lúmen intestinal através de transportadores, como a proteína de resistência a múltiplas drogas 2 (MRP2) e a proteína de resistência ao câncer de mama 1 (BCRP1), localizados na membrana apical do enterócito (PLANAS et al., 2012; NUNES et al., 2018). Os metabólitos de resveratrol também podem efluir através do lado basal dos enterócitos via MRP3, até atingirem a circulação portal (PLANAS et al., 2012; NUNES et al., 2018). Uma vez na circulação portal, o resveratrol e seus metabólitos chegam ao fígado, onde parte do resveratrol que não foi conjugado no enterócito do intestino delgado é metabolizado em seus derivados glucuronidados e sulfatados (NUNES et al., 2018). No entanto, podem ser reciclados de volta ao intestino delgado através da bile ou excretados pela urina (Figura 15) (NUNES et al., 2018; LUCA et al., 2020).

O resveratrol-3-O-glicuronídeo, resveratrol-4'-O-glicuronídeo, resveratrol-3-O-sulfato e resveratrol-4'-O-sulfato foram descritos como os principais metabólitos de resveratrol gerados no intestino delgado e no fígado (Figura 16) (NUNES et al., 2018; LUCA et al., 2020). Foi observado em ratos e porcos, que os glicuronídeos de *trans*-resveratrol são os principais metabólitos (MARIER et al., 2002; AZORÍN-ORTUÑO et al., 2010), enquanto em humanos os sulfatos de *trans*-resveratrol são as principais formas conjugadas (BOOCOOCK et al., 2007; BROWN et al., 2010). As bactérias presentes no intestino grosso também contribuem para o metabolismo do resveratrol, tendo a capacidade de convertê-lo por hidrogenação em di-hidro-resveratrol (DHR), que é parcialmente absorvido e posteriormente metabolizado no fígado nas formas conjugadas (monossulfato e monoglicuronídeo) que podem ser facilmente eliminadas na urina (LUCA et al., 2020). Além do DHR, dois metabólitos adicionais têm sido

identificados tanto *in vitro* quanto *in vivo* o 3,4'-dihidroxi-trans-estilbeno e 3,4'-dihidroxibenzil (lunularina) (Figura 16) (LUCA *et al.*, 2020).

Devido ao alto grau de lipofilicidade, o resveratrol circula no plasma através da ligação a proteínas plasmáticas, como a albumina ou lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que ocorre em alta extensão (até 90% do resveratrol livre) (NUNES *et al.*, 2018; LUCA *et al.*, 2020). Uma vez na corrente sanguínea o resveratrol e seus metabólitos atingem vários órgãos e tecidos, seguido de sua eliminação na urina (NUNES *et al.*, 2018). Aproximadamente a eliminação total após a administração oral de resveratrol em humanos varia de 71% a 98%, com 53–85% na urina e 3,3–35% nas fezes. Na urina, os metabólitos foram responsáveis por 22–44% da dose ingerida, com 11–31% de conjugados de sulfato e 9–16% de glicuronídeos (WALLE, 2011; TOMÉ-CARNEIRO *et al.*, 2013; LUCA *et al.*, 2020).

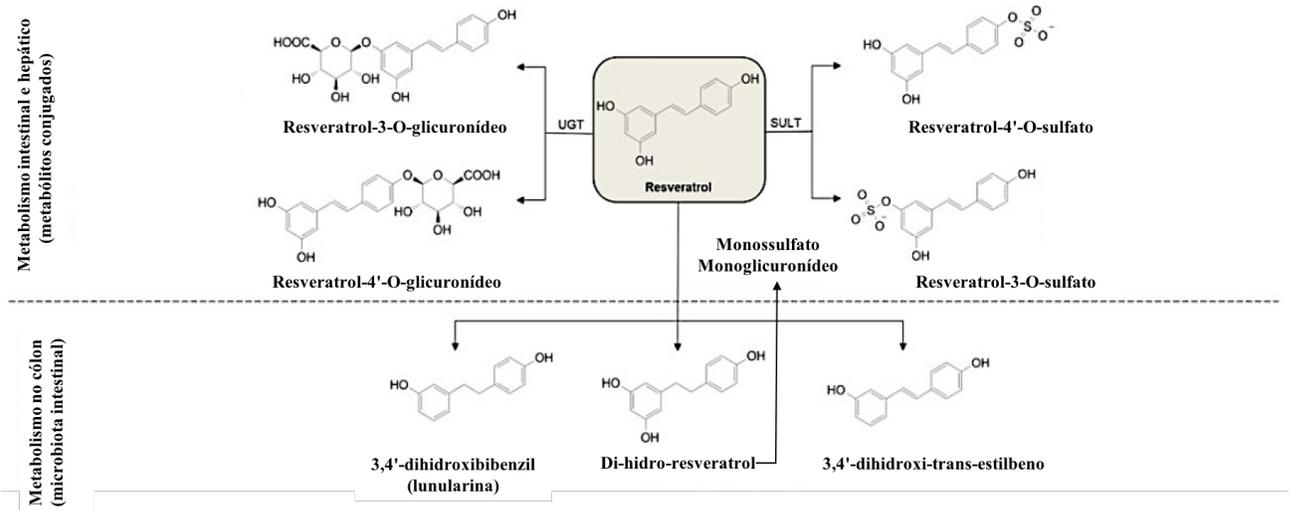
Figura 15 - Absorção, metabolismo e excreção do *trans*-resveratrol.



Fonte: NUNES *et al.*, 2018.

RSV: resveratrol na forma de aglicona; G-RSV: glicosídeo de resveratrol; SGLT1: transportador de glicose dependente de sódio 1; CBG: glicosidase citosólica; BG:  $\beta$ -glicosidases; MF: microflora intestinal; MRP2: proteína de resistência a múltiplas drogas 2; BCRP1: proteína de resistência ao câncer de mama 1; MRP3: proteína de resistência a múltiplas drogas 3; UGT: uridina-5'-difosfato-glucuronosiltransferase; SULT: sulfotransferase; RSV-glicuronídeos: glicuronídeos de resveratrol; RSV- sulfatos: sulfatos de resveratrol; A: albumina; LDL: proteína de baixa densidade.

Figura 16 - Principais metabólitos do *trans*-resveratrol.



**Fonte:** Adaptado de LUCA *et al.*, 2020. UGT: uridina-5'-difosfato-glucuronosiltransferase; SULT: sulfotransferase.

### 2.5.2.5 Principais atividades biológicas do resveratrol

O resveratrol possui diversas atividades biológicas, dentre elas: antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética e neuroprotetora (NEVES *et al.*, 2012; GAMBINI *et al.*, 2015; GALINIAK, AEBISHER e BARTUSIK-AEBISHER).

#### 2.5.2.5.1 Atividade antioxidante do resveratrol

O resveratrol é um poderoso antioxidante cuja atividade está associada à presença de três grupos hidroxila em sua estrutura (LIGUORI *et al.*, 2018). O resveratrol exerce ação antioxidante, através de mecanismos diretos, como a neutralização de ERO e espécies reativas de nitrogênio, e mecanismos indiretos, como a capacidade de aumentar a atividade transcricional do fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2) e FOXO (TRUONG, JUN, e JEONG 2017). Experimentos em culturas de células expostas a alta concentração de glicose ou a citocinas pró-inflamatórias e resveratrol, mostram uma redução nos níveis de ERO (YEN *et al.*, 2011). O estresse oxidativo é definido como o desequilíbrio entre a geração de ERO e a defesa antioxidante, com consequente aumento de ERO (LIGUORI *et al.*, 2018). O aumento do estresse oxidativo danifica estruturas e prejudica suas funções, o que está por trás de muitas

doenças como: câncer, diabetes, doença renal crônica, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (LIGUORI *et al.*, 2018). Em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica, o resveratrol, foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e de diminuir a expressão de mediadores inflamatórios melhorando a inflamação (WANG *et al.*, 2013). O estudo de Cheng e colaboradores (2019) revelou que o resveratrol previne a esteatose hepática em camundongos obesos alimentados com dieta rica em gordura, reduzindo o estresse oxidativo e a inflamação. A administração oral de resveratrol na dose de 5 mg/kg/dia, em ratos diabéticos, levou à normalização do status antioxidante, exacerbado pelo estresse oxidativo induzido pela hiperglicemia (HUSSEIN e MAHFOUZ, 2016). Em humanos, a ingestão de resveratrol tem reduzido o estresse oxidativo tanto em indivíduos saudáveis quanto em pacientes com doenças metabólicas caracterizadas por alto grau de estresse oxidativo (QURESHI *et al.*, 2012). No estudo de Qureshi *et al.*, 2012 foi observado aumento significativo da capacidade antioxidante total em idosos saudáveis e indivíduos hipercolesterolêmicos, após a suplementação com resveratrol. A ingestão do extrato de uva contendo resveratrol diminuiu o estresse oxidativo em mulheres adultas, conforme determinado pela diminuição das concentrações urinárias de isoprostano (molécula produzida pelo ataque de radicais livres nos ácidos graxos insaturados) (ZERN *et al.*, 2005). Em pacientes diabéticos tipo 2, a suplementação com resveratrol reduz os marcadores de estresse oxidativo, que foram acompanhados por uma melhora da sensibilidade à insulina, pressão arterial e função cardiovascular (BRASNYÓ *et al.*, 2011). A melhora da sensibilidade à insulina e das complicações diabéticas estariam relacionadas com a capacidade do resveratrol de reduzir o estresse oxidativo (BRASNYÓ *et al.*, 2011).

#### 2.5.2.5.2 Atividade anti-inflamatória do resveratrol

Estudos demonstraram que o resveratrol exerce atividade anti-inflamatória e demonstraram sua capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como a atividade das ciclooxigenases (COX) 1 e 2 e da sintase do óxido nítrico induzível. Este efeito anti-inflamatório é mediado principalmente pela capacidade de inibir a atividade transcricional do fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) e proteína ativadora-

1 (DEVORAKOVA e LANDA 2017), e pode ser atribuído ao efeito modulador da expressão de microRNAs com papel anti-inflamatório ou um pró-inflamatório (LATRUFFE *et al.*, 2015). Além disso, estudos em humanos relataram que o resveratrol pode ter efeito anti-inflamatório tanto em indivíduos saudáveis (GHANIM *et al.*, 2011) como em pacientes diabéticos e hipertensos (TOMÉ-CARNEIRO *et al.*, 2013). A ingestão, em dose única, de 100 mg de resveratrol e 75 mg de polifenóis totais extraídos da uva muscadine, foi capaz de diminuir marcadores inflamatórios em indivíduos saudáveis após uma refeição rica em gorduras e carboidratos (GHANIM *et al.*, 2011). A suplementação a longo prazo com extrato de uva, fonte de resveratrol, em pacientes diabéticos tipo 2 e hipertensos, diminuiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias e de microRNAs relacionados à inflamação (TOMÉ-CARNEIRO *et al.*, 2013). No entanto, em um estudo envolvendo pacientes diabéticos tipo 2, a suplementação de 800 mg/dia de resveratrol não alterou os níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias (KHODEBANDEHLOO *et al.*, 2018).

#### 2.5.2.5.3 Atividade antidiabética do resveratrol

Estudos em cultura de células e animais têm contribuído para a compreensão do mecanismo da ação do resveratrol no controle glicêmico e na resistência à insulina (LAGOUGE *et al.*, 2006; BAGUL *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2012). O uso de resveratrol em camundongos resistentes à insulina foi capaz de reduzir a glicemia e a insulinemia, melhorando a resistência à insulina (LAGOUGE *et al.*, 2006; BAGUL *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2012). Sabe-se que o resveratrol melhora a sensibilidade à insulina pela ativação da AMPK (LAGOUGE *et al.*, 2006) e Akt (KANG *et al.*, 2012) e pela redução da expressão de adipocinas que influenciam a sensibilidade à insulina (COSTA *et al.*, 2011). Yoshimo *et al.* (2012) não encontraram alterações na sensibilidade à insulina, nos níveis de insulina e de glicose em mulheres não obesas, após a suplementação com resveratrol (75 mg/d) durante 12 semanas. No entanto, em outros estudos, a diminuição na glicemia e a melhora na pontuação do modelo homeostático de resistência à insulina (HOMA-IR) foram observadas após a suplementação com 150 mg de resveratrol por 30 dias em indivíduos obesos (TIMMERS *et al.*, 2011; KNOP *et al.*,

2013). Contudo, em pacientes diabéticos tipo 2, foi ineficaz em melhorar a sensibilidade à insulina seguindo o mesmo protocolo de suplementação (TIMMERS *et al.*, 2016).

#### 2.5.2.5.4 Atividade neuroprotetora do resveratrol

O resveratrol também está envolvido na redução do dano neuronal e na melhora da função do sistema nervoso central (ATES *et al.*, 2007; CORPAS *et al.*, 2019; MIGUEL *et al.*, 2021). O resveratrol demonstrou reduzir a neurodegeneração no córtex cerebral murino e melhorar a recuperação da memória (SHARMA *et al.*, 2018). Além disso, a administração de resveratrol melhora a cognição, aprendizagem e memória em ratos com demência (MA *et al.*, 2013). O estudo de Corpas e colaboradores (2019) determinou que o resveratrol também melhora a cognição e induz neuroproteção em modelo de doença de Alzheimer em camundongos. O resveratrol tem mostrado aliviar a dor neuropática em camundongos através da diminuição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TAO *et al.*, 2016). Além disso, o resveratrol induz a expressão de SIRT1, que desempenha um papel importante na proteção de neurônios contra ERO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, óxido nítrico (NO) no cérebro (ANEKONDA 2006). Por um lado, a SIRT1 suprime as atividades apoptóticas dos fatores de transcrição *Forkhead box-O* (FOXO) e promove a sobrevivência neuronal, por outro lado, a SIRT1 inibe NF-κB e subsequentemente suprime iNOS e catespina B, os dois fatores tóxicos da neurodegeneração (BORRA, SMITH e DENU 2005; ANEKONDA 2006). Sugerindo que o efeito neuroprotetor do resveratrol também estaria relacionado a suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (NEVES *et al.*, 2012).

### **3 HIPÓTESE**

A administração neonatal de kaempferol ou resveratrol em ratos é capaz de contribuir para o adequado crescimento somático, potencializar o desempenho locomotor e antecipar o ponto de saciedade. Diante o desafio de jejum de 24 horas ambos polifenóis são capazes de proteger o organismo dos animais e potencializar o uso de lipídeos como fonte de energia, evidenciado através do aumento da expressão de genes relacionados com a flexibilidade metabólica muscular.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 GERAL

Avaliar os efeitos da administração neonatal de kaempferol ou resveratrol sobre o crescimento somático, desenvolvimento da locomoção, comportamento alimentar, perfil bioquímico e flexibilidade metabólica muscular de ratos machos.

### 4.2 ESPECÍFICOS

Avaliar nos filhotes que receberam kaempferol ou resveratrol durante o período neonatal:

- crescimento somático (peso corporal e eixo longitudinal);
- índice de Lee;
- tolerância à glicose;
- desenvolvimento da locomoção;
- comportamento alimentar através da SCS;
- comportamento locomotor diante a restrição alimentar;
- peso de órgãos;
- perfil bioquímico sanguíneo;
- expressão de genes relacionados com o metabolismo de lipídios e reguladores de transcrição.

## 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 nº de processo 0052/2019 (ANEXO 1). A manipulação e os cuidados com os animais seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

### 5.2 ANIMAIS

Para o acasalamento foram utilizadas 30 ratas albinas da linhagem *Wistar* e 15 ratos machos adultos, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Para escolha das ratas foram utilizados alguns critérios: 1) idade entre 90 e 120 dias de vida, peso entre 220 e 250 gramas e 3) 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  $23^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , ciclo invertido 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 à alimentação. Após o período de adaptação, os roedores foram colocados em gaiola-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-maternidades, onde tiveram livre acesso a água filtrada e a dieta padrão de laboratório (Presence®, Brasil).

Um dia após o nascimento, os neonatos foram separados das respectivas mães para serem pesados e selecionados. A ninhada foi ajustada para oito filhotes (com o máximo de filhotes machos, sendo utilizadas as fêmeas apenas para completar a ninhada). No primeiro dia pós-natal (DPN), foram escolhidos os filhotes machos com peso entre 5,3 e 8,7 g. Os animais que foram 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 kaempferol, ao resveratrol e à solução veículo por via intraperitoneal. A partir do 21° dia pós-natal, os filhotes foram separados das mães (desmame), ficando em gaiolas individuais até o 30° dia pós-natal. Entre o 31° e 50° dia, os filhotes ficaram em gaiolas conjuntas (3 animais / gaiola) e posteriormente foram acondicionados em gaiolas individuais do 51° até 60° dia de vida. A partir do desmame, os filhotes receberam dieta padrão de biotério (Presence®, Brasil). Para as avaliações, foram escolhidos animais de forma a evitar que irmãos estivessem presentes nos mesmos subgrupos.

### 5.3 ADMINISTRAÇÃO DOS POLIFENÓIS

Durante o período de lactação, os filhotes foram divididos de acordo com o tratamento farmacológico que receberam. Uma parte dos filhotes recebeu kaempferol (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) na dose de 1 mg/kg de peso corporal via intraperitoneal (i.p) (XIAO *et al.*, 2012), outra parte recebeu resveratrol (Roval, Brasil) na dose de 1 mg/kg de peso corporal i.p (LI *et al.*, 2002), e outra parte dos animais recebeu solução veículo (dimetilsulfóxido, DMSO) i.p. O kaempferol e o resveratrol foram obtidos no formato de cristais sólidos sendo, posteriormente, dissolvidos em solução obtida pela mistura (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) e salina (NaCl), numa concentração final de 1% DMSO. As administrações ocorreram nos filhotes do 1° ao 21° dia pós-natal.

Diariamente, os filhotes tiveram seus pesos aferidos individualmente para preparo das doses (foi utilizado volume de 100µl/10g de peso corporal), sendo aplicadas através de seringa para insulina descartáveis, próprias para cada animal. Outros cuidados incluíram a alternância dos quadrantes inferiores esquerdo e direito do abdômen ao administrar as substâncias, a fim de evitar complicações como edemas, desconforto, entre outras.

#### 5.4 MANIPULAÇÃO DO *STATUS* NUTRICIONAL AO SACRIFÍCIO

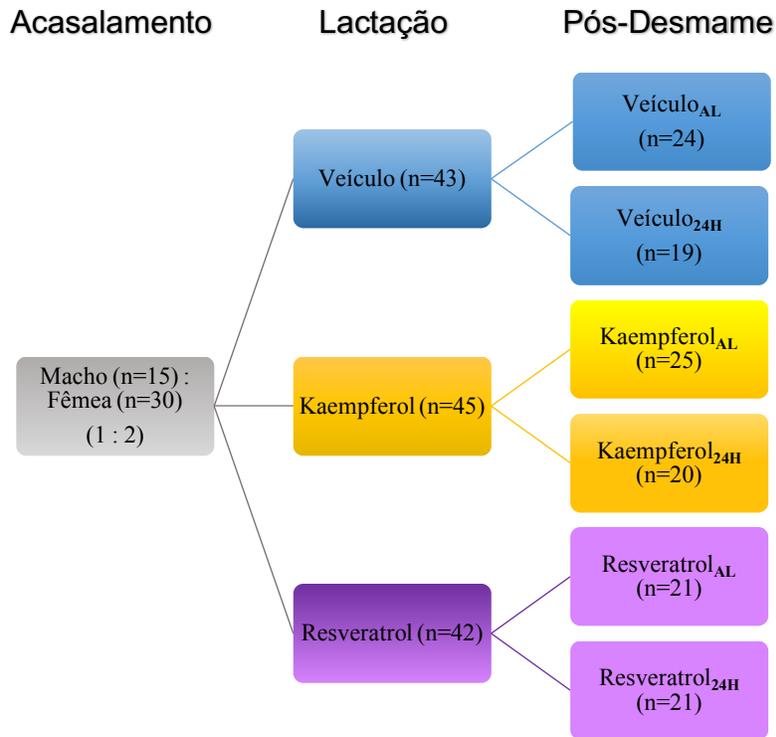
Para responder aos diferentes objetivos do trabalho, alguns experimentos foram realizados com os animais em estado alimentado (basal) ou com jejum de 24h. No estudo das alterações fenotípicas basais, foram comparados animais, dos diferentes grupos, sacrificados no *status* alimentado. Esses animais foram sacrificados após duas horas da troca do ciclo invertido. Foi avaliada a ingestão da dieta (diferença entre a ofertada e o rejeito após 2 horas da troca do ciclo), isso garantiu que todos os animais estivessem alimentados ao sacrifício.

Para o estudo da flexibilidade metabólica, os animais foram avaliados após 24 horas de jejum. Durante o jejum, os animais tiveram livre acesso à água. Os animais passaram por 3 períodos de jejum, aos 30 e 60 dias, quando foi avaliada a atividade locomotora e a sequência comportamental de saciedade e aos 70 dias quando foi realizado o sacrifício. Em todos os momentos, foi observado rigorosamente o tempo de jejum com a realização de experimentos em poucos animais em cada dia.

#### 5.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Inicialmente, os animais foram divididos em três grupos experimentais, de acordo com a exposição aos polifenóis ou à solução veículo durante o período de lactação: Grupo Veículo (n=43), Grupo Kaempferol (n=45), Grupo Resveratrol (n=42). Posteriormente, cada grupo foi subdividido segundo o *status* nutricional (alimentado ou jejum de 24 horas): alimentados (Veículo<sub>AL</sub>, Kaempferol<sub>AL</sub>, Resveratrol<sub>AL</sub>) e jejum de 24 horas (Veículo<sub>24H</sub>, Kaempferol<sub>24H</sub>, Resveratrol<sub>24H</sub>) (Figura 1). O status nutricional foi utilizado em algumas análises de atividade locomotora, da sequência comportamental de saciedade e ao sacrifício, sendo os detalhes descritos mais adiante.

Figura 1 - Distribuição dos animais nos diferentes grupos experimentais.



Fonte: A autora, 2023.

AL: alimentado; 24H: jejum de vinte e quatro horas.

## 5.6 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 5.6.1 Avaliações somáticas dos filhotes

O peso corporal foi avaliado todos os dias desde o 1º DPN até o 21º DPN e após o desmame a cada 7 dias, através de uma balança eletrônica digital – Marte, modelo S-1000, com capacidade máxima de 1000g e sensibilidade de 0,01g. O eixo-longitudinal foi avaliado semanalmente durante o período de lactação e após o desmame, sendo considerado como a distância entre o focinho e o ânus do animal (DA SILVA *et al.*, 2005). Para avaliar o eixo longitudinal, durante o período de lactação foi usado um paquímetro KINGTOOLS®, com precisão de 0,1mm e após o desmame foi usada uma fita inelástica PrimeMed®, com precisão de 0,1cm. Posteriormente o peso corporal e o eixo-longitudinal foram utilizados para calcular o índice de massa corporal (IMC): peso (g)/eixo-longitudinal (cm)<sup>2</sup> (NOVELLI *et al.*, 2007), o mesmo que foi calculado a cada 7

dias desde o 1º DPN até o 63º DPN. Aos 63 dias de vida, o índice de Lee foi calculado pela fórmula: raiz cúbica do peso corporal (g)/comprimento naso-anal (cm) (BERNARDIS, 1970). Valores acima de 0,3 predizem obesidade. Todas as avaliações descritas aconteceram entre às 8 e 10 horas da manhã.

### **5.6.2 Avaliação da variação de peso corporal**

Aos 30, 60 e 70 dias de idade, foi avaliada a perda de peso corporal após jejum de 24 horas nos animais pertencentes ao subgrupo jejum de 24 horas. O peso corporal foi registrado em dois momentos, antes e depois de iniciar o jejum de 24 horas. Posteriormente foi calculada a variação de peso pela fórmula [Peso Final (g) - Peso Inicial (g)].

### **5.6.3 Avaliação do consumo alimentar dos filhotes**

Após o desmame, os filhotes foram acondicionados em gaiolas individuais de polipropileno (30x20x19cm), passando por um período de adaptação de 3 dias (21º ao 24ºDPN) (FANTE *et al.*, 2016). O consumo alimentar absoluto (CAA) foi avaliado diariamente por cinco dias consecutivos (24º ao 29ºDPN) adaptado de (FANTE *et al.*, 2016), através da diferença entre a cota ofertada diariamente (CO) e o rejeito (RJ) mensurado após 24h. Posteriormente, o consumo alimentar absoluto foi dividido para o peso corporal (PC) e multiplicado por 100 para obtenção do consumo alimentar relativo (CAR). A mesma metodologia foi adotada com os animais de 51 dias de idade. Sendo o período de adaptação, do 51º ao 54ºDPN e a avaliação do consumo alimentar, do 54º ao 59ºDPN.

$$CAA: (CO - RJ)$$

$$CAR: \frac{CAA}{PC (g)} \times 100$$

#### 5.6.4 Atividade locomotora

Foi avaliada aos 8, 14, 17, 21, 30 e 60 dias de idade, apenas nos animais pertencentes ao subgrupo alimentado para o estudo do desenvolvimento da locomoção. Durante o período de lactação, os animais pertencentes ao subgrupo jejum de 24 horas foram expostos ao campo aberto para terem a mesma exposição que o subgrupo alimentado, mas não foram filmados. Contudo, com 30 e 60 dias de idade, a atividade locomotora dos animais foi avaliada após jejum de 24 horas para o estudo da influência do jejum sobre o comportamento locomotor. As filmagens ocorreram através de um sistema de monitoramento de pequenos animais durante a fase escura do ciclo circadiano (9:00h 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 ( $\varnothing 1\text{m}$ ), delimitado por paredes de 30 cm de altura. A trajetória do animal foi registrada, por uma câmera digital, durante cinco minutos ou 15 minutos, enquanto o animal se locomovia livremente no campo. Na troca dos animais, o campo foi 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 de um sistema automático de análise ANY-maze versão 6.1 de onde 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.

**Energia cinética (mJ):** É o gasto energético total durante o período de deslocamento.

**Potência média (mW):** Potência produzida durante o período de deslocamento.

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

**Número de paradas (n):** Número total de paradas realizadas no campo.

**Tempo de imobilidade/número de paradas (s):** Relação entre o tempo de imobilidade e o número total de paradas.

**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 (ARAGÃO RDA *et al.*, 2011).

### 5.6.5 Sequência comportamental de saciedade

Aos 30 e 60 dias de idade, após o teste de campo aberto, foi realizada a análise da sequência comportamental de saciedade (SCS) nos animais jejum de 24 horas, segundo a descrição de Halford, Wanninayake e Blundell (1998). Inicialmente, os animais foram alojados em gaiolas individuais e transparentes de polipropileno (30 × 20 × 19 cm). Seguidamente, a ração foi retirada do comedouro 24 horas antes do início do teste de sequência comportamental de saciedade. No seguinte dia, após a oferta de aproximadamente 30 g de ração, os animais eram imediatamente filmados por uma hora através de uma câmera equipada com sistema infravermelho. As imagens foram armazenadas para posterior análise da sequência comportamental de saciedade, por 2 observadores treinados e sem conhecimento prévio dos grupos experimentais. O consumo alimentar foi obtido pela diferença entre a quantidade de ração oferecida inicialmente e a quantidade de ração restante após o período de 1h. A taxa de alimentação foi calculada pela razão entre o consumo relativo (g) e o tempo de alimentação (min) (OROZCO-SÓLIS *et al.*, 2009).

Os comportamentos avaliados foram:

**Alimentação:** O animal se mostrou ingerindo alimento, roendo, mastigando e segurando ração com as patas;

**Limpeza:** O animal realizou movimentos de cuidado com o corpo, lambendo as patas anteriores e movimentando-as sobre a cabeça, com lambidas contínuas no ventre, dorso e patas posteriores;

**Repouso/descanso:** O rato apresentou posição de descanso, com o corpo recolhido e repousado sobre o assoalho da gaiola ou dormindo (posição anterior e olhos fechados).

Durante a análise da SCS, os comportamentos de alimentação, limpeza e descanso foram quantificados em 12 seções de 5 minutos, totalizando 60 minutos de vídeo. O ponto de saciedade foi determinado através da interseção entre os comportamentos de alimentação e o descanso. Outras medidas foram aferidas, como a ingestão relativa, tempo de latência para alimentação, duração e taxa de alimentação (HALFORD, WANNINAYAKE e BLUNDELL, 1998; ISHII *et al.*, 2003).

#### **5.6.6 Teste de tolerância à glicose**

Aos 62 dias de idade, apenas os animais pertencentes ao subgrupo alimentado (Veículo<sub>AL</sub>, Kaempferol<sub>AL</sub>, Resveratrol<sub>AL</sub>) foram submetidos ao teste de tolerância à glicose (GTT). Após 12 horas de jejum, foi coletada uma amostra de sangue inicial que corresponde aos níveis basais de glicose (T0), em seguida foi injetada solução de glicose à 50% (1mg/g de peso corporal) por via intraperitoneal. Após a administração da solução de glicose, foram coletadas amostras de sangue aos 15, 30, 45, 60 e 120 minutos (FIDALGO *et al.*, 2013). As análises foram feitas imediatamente com glicosímetro G-TECH Lite®.

#### **5.6.7 Coleta de amostras**

Os animais foram eutanasiados aos 70 dias de idade por decapitação com uso de guilhotina, não foi realizada administração de anestesia para evitar alterações nas concentrações das análises do perfil bioquímico.

O *status* nutricional ao sacrifício foi o apresentado no item 5.4. O sangue do tronco foi coletado em tubos sem EDTA, para separação do soro. O sangue foi centrifugado por 20 minutos, à 3500rpm. O soro foi armazenado à -80°C até análise.

Foram retirados e pesados os músculos sóleo, extensor longo dos dedos (EDL) e gastrocnêmios. Para as análises moleculares, os tecidos foram imediatamente congelados em gelo seco. Todas as amostras foram guardadas em freezer -80°C para

posterior análise. Também foram pesados: o encéfalo, fígado, tecido adiposo branco epididimal, retroperitoneal e mesentérico.

### **5.6.8 Análises bioquímicas**

O soro coletado dos animais eutanasiados, em estado alimentado e em jejum de 24 horas, foi analisado pelo método enzimático colorimétrico para a determinação de: glicose, colesterol total, colesterol HDL, triglicerídeos e albumina. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro EPOCH™ (BIOTEK®, Winooski, Vermont, USA), em triplicata, usando placa de 96 poços. Foram utilizados os kits glicose (Ref. 133) e albumina (Ref. 19) (Labtest, Lago Santa, Minas Gerais, Brasil) e os kits colesterol total (Ref. K083), colesterol HDL (Ref. K015) e triglicerídeos (Ref. K117) (Bioclin, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). Os procedimentos seguiram o protocolo descrito pelo fabricante. Todas as análises bioquímicas ocorreram em todos os subgrupos.

### **5.6.9 Análise da expressão de genes no músculo**

As análises de PCR ocorreram em todos os subgrupos: alimentados e jejum de 24 horas, a fim de determinar a flexibilidade metabólica. Foram usadas amostras (músculo sóleo) de seis animais de cada grupo. Inicialmente, o músculo sóleo foi homogeneizado em reagente Trizol® (Invitrogen) para subsequente extração do RNA total. Os procedimentos de extração seguiram o recomendado pelo fabricante. Em resumo, 50-100mg de tecido foram homogeneizados em 1ml de Trizol®, depois de 5 minutos de incubação, 200µl de clorofórmio foram adicionados para permitir a separação das fases. Após centrifugação, a fase aquosa foi recuperada, e 500 µl de álcool isopropílico adicionado, para precipitar o RNA. Após centrifugação, o pelete foi lavado em etanol a 75% e redissolvido em água livre de RNases. O RNA total foi quantificado utilizando-se Nanodrop e sua pureza verificada pela relação A260/280 sendo usadas apenas amostras que obtiveram um grau de pureza superior a 1,9. Em seguida 700pg de RNA foi utilizado para amplificação PCR em tempo real utilizando SuperScript® III Platinum® SYBR® Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante. Foi analisada a expressão gênica de proteínas e

reguladores de transcrição envolvidos no metabolismo energético: *Pgc1α*, *Bhad*, *Myh7*, *Foxo1* e *Pdk4*. O gene beta-2 microglobulina (*B2m*) foi o controle endógeno. Os níveis relativos de expressão de mRNAs em diferentes amostras foi calculado usando o método comparativo  $2^{-\Delta\Delta CT}$ .

Tabela 1 - Sequência de primer RT-qPC

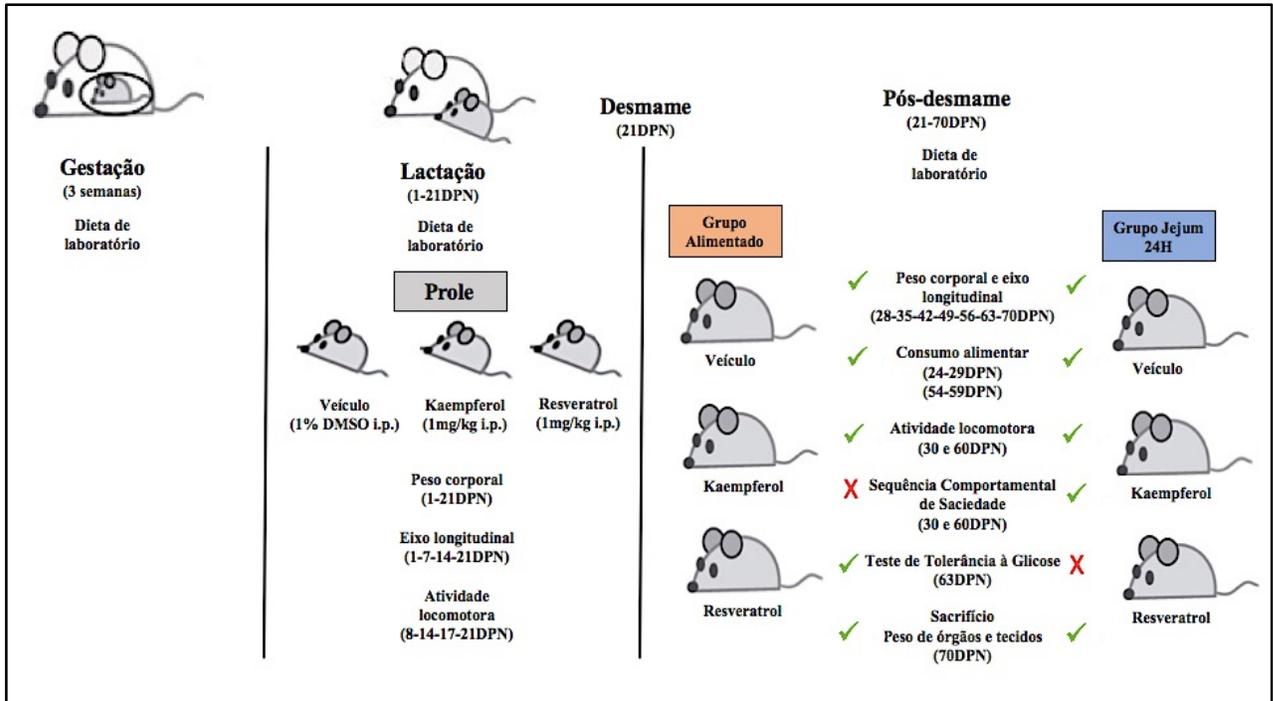
Gene	Símbolo	Forward primer (5' - 3')	Reverse primer (3' - 5')
PPAR-gama, coativador 1α	<i>Pgc1α</i>	ACACCGCACACATCGCAATTC	TTCGTCCCTCTTGAGCCTTTCG
Hidroxiacil-coenzima A desidrogenase	<i>Bhad</i>	CTCCATGTCCTCCTCTTCCTCTGC	CAGCCCGCCGCCGATGAC
Cadeia pesada de miosina 7	<i>Myh7</i>	ACAGAGGAAGACAGGAAGAACCTAC	GGGCTTCACAGGCATCCTTAG
Piruvato desidrogenase quinase, isoenzima 4	<i>Pdk4</i>	GGTGGCGGTGTTCTCTGAG	TGAATTGTCCATCACAGGCGTTG
Fatores de transcrição forkhead	<i>Foxo1</i>	TTCAATTCGCCACAATCTGTCC	GGGTGATTTTCCG CTCTTGC
beta-2 microglobulina	<i>B2m</i>	CGAGACCGATGTATATGCTTGC	GTCCAGATGATTCAGAGCTCCA

Fonte: A autora, 2023.

## 5.7 DESENHO EXPERIMENTAL DA METODOLOGIA

A realização dos experimentos de acordo à metodologia exposta acima é mostrada através do seguinte esquema (Figura 2).

Figura 2 - Desenho experimental de acordo à metodologia do estudo.



Fonte: A autora, 2023.

## 5.8 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 Shapiro-Wilk para as variáveis: peso corporal, eixo longitudinal, % de ganho de peso corporal, índice de massa corporal (IMC), índice de Lee, consumo relativo diário médio, glicemia basal, TTG, AUC, parâmetros da atividade locomotora, parâmetros da SCS, bioquímica sanguínea, peso relativo de tecidos e órgãos. O teste ANOVA *one-way* com pós-teste de Tukey foi utilizado na avaliação da % de ganho de peso, índice de Lee, consumo relativo diário médio, glicemia basal, AUC, parâmetros da SCS. O teste ANOVA *two-way* com medidas repetidas (polifenol x idade) com pós-teste de Tukey foi utilizado na avaliação do peso corporal, eixo longitudinal, IMC, TTG, parâmetros da atividade locomotora. O teste ANOVA *two-way* com medidas repetidas (status nutricional x polifenóis) com pós-teste de Tukey foi utilizado na avaliação

bioquímica sanguínea, peso relativo de tecidos e órgãos, parâmetros da atividade locomotora. Apenas para a potência média foi usado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn's. O teste de qui-quadrado foi utilizado para comparação do número de animais que não descansaram na SCS. Os dados são apresentados em média  $\pm$  erro padrão da média (EP). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## 6 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados conforme o planejamento de submissão de dois artigos originais: **Artigo Original 1 – “Efeitos do uso neonatal de kaempferol ou resveratrol no desenvolvimento somático e na locomoção de ratos machos”** e **Artigo Original 2 – “Repercussões da administração neonatal de kaempferol ou resveratrol na atividade locomotora, comportamento alimentar, perfil bioquímico e flexibilidade metabólica muscular de ratos machos”**.

### 6.1 ARTIGO ORIGINAL 1 - “EFEITOS DO USO NEONATAL DE KAEMPFEROL OU RESVERATROL NO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO E NA LOCOMOÇÃO DE RATOS MACHOS”

#### 6.1.1 Evolução do crescimento somático da prole durante o período de lactação e no pós-desmame

No período de lactação, na prole, foi observado maior peso corporal no 19º DPN e no 21º DPN nos filhotes do grupo Kaempferol em relação aos filhotes do grupo Veículo (DPN19: Veículo =  $34,43 \pm 0,81$ ; Kaempferol =  $36,28 \pm 0,73$ ; em gramas,  $p < 0,05$ ; DPN21: Veículo =  $40,06 \pm 1,04$ ; Kaempferol =  $42,68 \pm 1,04$ ; em gramas  $p < 0,01$ ) (Figura 1A). A porcentagem de ganho de peso, avaliada do 1º ao 21º dia pós-natal, não apresentou diferenças entre os grupos experimentais (Figura 1B).

Figura 1 - Peso corporal e porcentagem de ganho de peso de ratos machos durante o período de lactação.

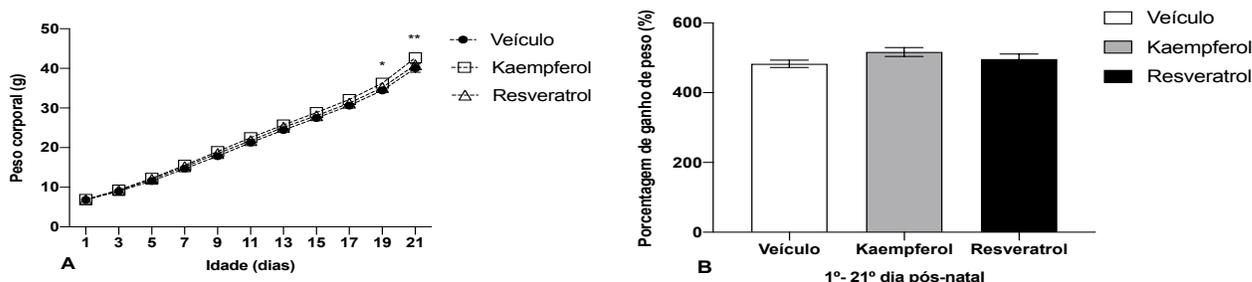


Figura 1 - Peso corporal e porcentagem de ganho de peso de ratos machos durante o período de lactação. Peso corporal (A), porcentagem de ganho de peso (B). Grupos experimentais: Veículo (n= 24); Kaempferol (n= 23); Resveratrol (n= 19). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *one way* (B) e *two way* ANOVA medidas repetidas (A), seguido do pós-teste Tukey; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$  Kaempferol vs. Veículo.

Em relação ao eixo-longitudinal avaliado durante o período de lactação, não foram encontradas diferenças entre os grupos (Figura 2).

Figura 2 - Eixo-longitudinal de ratos machos durante o período de lactação.

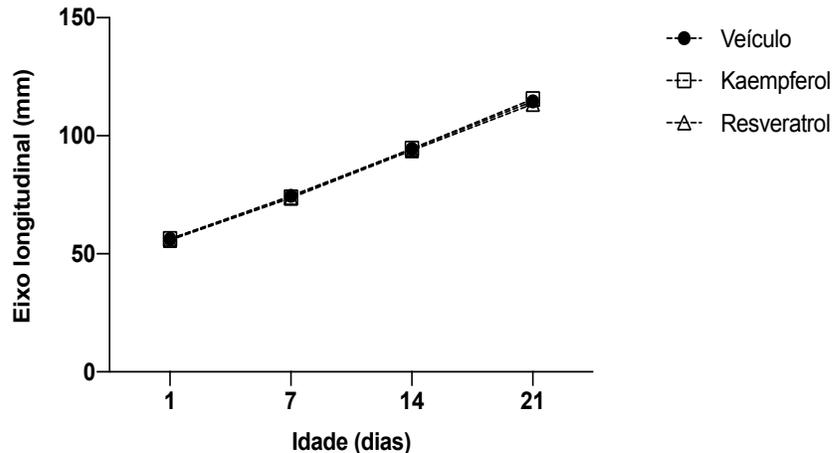


Figura 2. Eixo-longitudinal de ratos machos durante o período de lactação. Grupos experimentais: Veículo (n= 13); Kaempferol (n= 15); Resveratrol (n= 16). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *two way* ANOVA medidas repetidas, seguido do pós-teste Tukey.

Após o período de aleitamento, a prole de cada grupo experimental continuou sendo avaliada a cada sete dias até os 63 dias de idade. Quanto ao peso corporal e ao eixo-longitudinal pós-desmame, não houve diferenças entre os grupos (Figura 3A e 5B).

Figura 3 - Peso corporal e eixo-longitudinal de ratos machos pós-desmame.

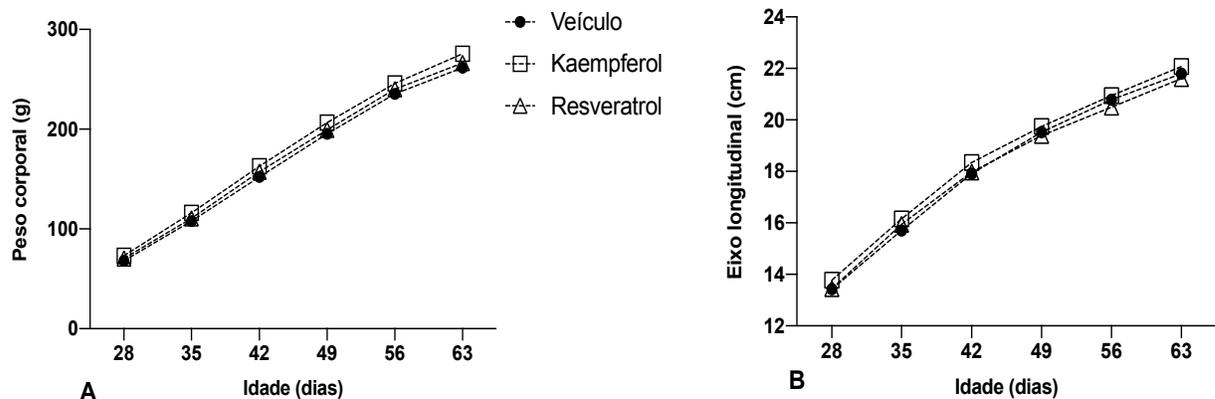


Figura 5 - Peso corporal e eixo-longitudinal de ratos machos pós-desmame. Peso corporal (A), eixo-longitudinal (B). Grupos experimentais: Veículo (n= 23-24); Kaempferol (n= 24); Resveratrol (n= 21). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *two way* ANOVA medidas repetidas (A e B), seguido do pós-teste de Tukey.

### 6.1.2 Avaliação do índice de massa corporal (IMC) e índice de Lee

O IMC foi avaliado a cada sete dias a partir do 1º DPN até 63º DPN e o Índice de Lee foi avaliado aos 63 dias de idade. Em ambos os índices, não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais (Figura 4A e 4B).

Figura 4 - Índice de massa corporal e índice de Lee de ratos machos.

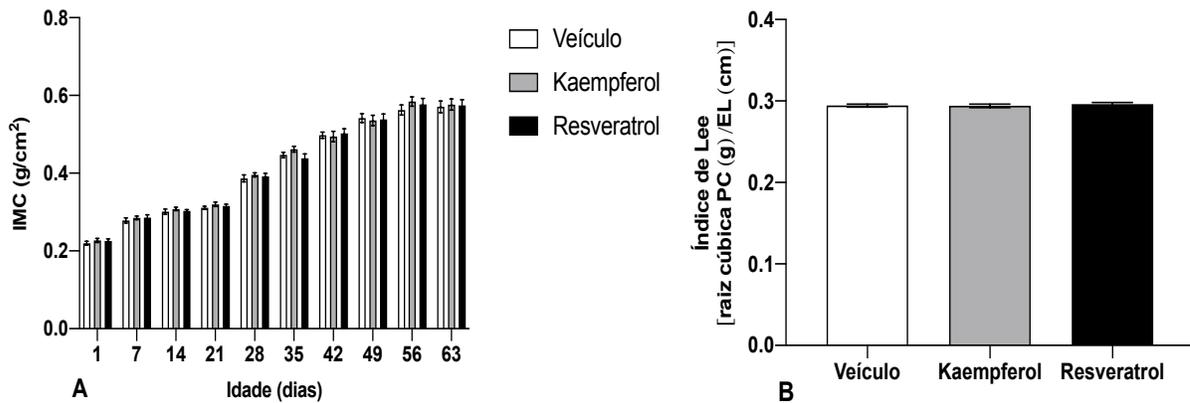


Figura 4 - Índice de massa corporal e índice de Lee de ratos machos. Índice de massa corporal (A), Índice de Lee (B). Grupos experimentais: Veículo (n= 12-24); Kaempferol (n=14-25); Resveratrol (n=14-20). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *one-way* (B) e *two-way* ANOVA medidas repetidas (A), seguido do pós-teste Tukey.

### 6.1.3 Consumo alimentar relativo de ratos machos após o desmame

O consumo alimentar relativo foi mensurado diariamente em dias consecutivos, do 24º ao 29º DPN e do 54º ao 59º DPN. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais em ambos os períodos de avaliação (Figura 5).

Figura 5 - Consumo alimentar relativo diário médio de ratos machos pós-desmame.

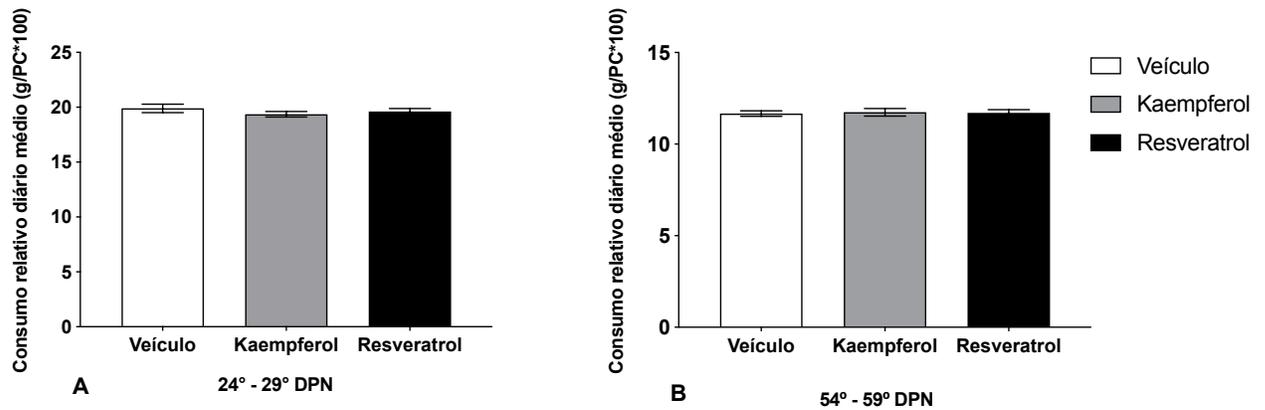


Figura 5 - Consumo alimentar relativo diário médio de ratos machos pós-desmame. Consumo alimentar relativo do 24° ao 29° DPN (A), Consumo alimentar relativo do 54° ao 59° DPN (B). Grupos experimentais: Veículo (n= 21-24); Kaempferol (n= 24-25); Resveratrol (n= 20). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *one-way* ANOVA, seguido do pós-teste Tukey.

#### 6.1.4 Efeitos do uso neonatal de polifenóis na resposta glicêmica

O perfil glicêmico da prole foi analisado pelo teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGip) aos 62 dias de idade. Observou-se aumento da curva glicêmica aos 15 minutos após o início do teste, em ambos os grupos de animais que receberam Kaempferol e Resveratrol durante o período neonatal (Veículo =  $371,9 \pm 14,03$ ; Kaempferol =  $406,4 \pm 10,07$ ; Resveratrol =  $428,7 \pm 19,30$ ; em mg/dl,  $p < 0,05$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 6A). Em relação a área sob a curva não foram encontradas diferenças entre os grupos experimentais (Figura 6B). Quando comparamos a glicemia de jejum (tempo = 0) entre os grupos, não observamos diferenças (Veículo =  $113,6 \pm 2,73$ ; Kaempferol =  $122,3 \pm 4,58$ ; Resveratrol =  $112,0 \pm 2,71$ ; em mg/dl,  $p = 0,191$ ;  $p = 0,949$ ;  $p = 0,124$ ) (Figura 6C).

Figura 6 - Perfil glicêmico de ratos machos jovens.

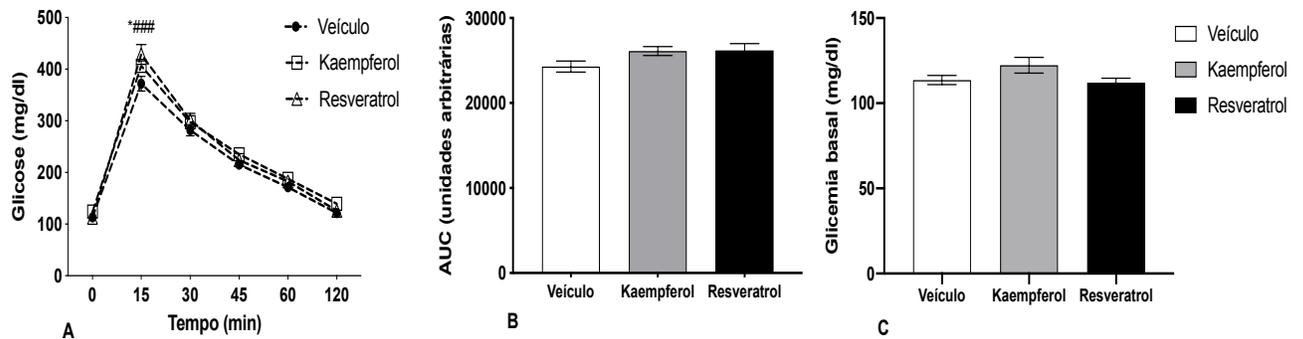


Figura 6 - Perfil glicêmico de ratos machos jovens. Concentração de glicose sanguínea (mg/dl) durante o teste de tolerância à glicose intraperitoneal no 62º DPN (A), área sob a curva do GTT (B), glicemia de jejum (tempo = 0) (C). Grupos experimentais: Veículo (n=16); Kaempferol (n=17); Resveratrol (n=14). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *one-way* (B e C) e *two-way* ANOVA medidas repetidas (A), seguido do pós-teste Tukey; \* $P < 0,01$  Kaempferol vs. Veículo; ### $P < 0,001$  Resveratrol vs. Veículo.

### 6.1.5 Efeitos dos polifenóis sobre a atividade locomotora

A atividade locomotora dos animais foi avaliada no 8º, 14º, 17º, 21º, 30º e 60º DPN. São apresentados no texto as diferenças intragrupos (mesmo grupo em diferentes idades) e intergrupos (mesma idade em diferentes grupos). Apenas as diferenças intergrupos são mostradas em figuras (Figuras 7 e 8).

Inicialmente, vamos apresentar o estudo da evolução da atividade locomotora da prole. Desta forma vamos apresentar em formato escrito as diferenças intragrupos comparando as idades. Foi possível observar que a distância percorrida teve aumento progressivo, no grupo veículo do 14º DPN até 30º DPN ( $p < 0,0001$ ). No grupo de animais kaempferol teve aumento progressivo da distância percorrida do 8º DPN até 30º DPN ( $p < 0,0001$ ), e no grupo de animais resveratrol do 8º DPN até 21º DPN ( $p < 0,0001$ ). Quanto à velocidade média, os animais do grupo veículo e kaempferol apresentaram aumento progressivo do 8º DPN até 30º DPN ( $p < 0,0001$ ) e nos animais do grupo resveratrol do 8º DPN até 21º DPN ( $p < 0,0001$ ).

Ao avaliarmos a energia cinética, foi possível observar aumento em todos os grupos experimentais do 21º DPN até 60º DPN ( $p < 0,0001$ ). A potência média apresentou aumento apenas entre o 30º DPN e 60º DPN ( $p < 0,0001$ ) em todos os grupos experimentais. No tempo que o animal permaneceu imóvel no campo aberto, foi

observado diminuição da imobilidade entre o 14º DPN e 17º DPN ( $p < 0,0001$ ) e entre o 21º DPN e 30º DPN ( $p < 0,01$ ) no grupo veículo, enquanto que, ambos os grupos de polifenóis apresentaram redução do 8º DPN até 17º DPN ( $p < 0,0001$ ). Em relação ao número de paradas no campo aberto, foi observado aumento entre o 14º DPN e 17º DPN apenas no grupo veículo ( $p < 0,01$ ). Não foram encontradas diferenças no tempo médio gasto em cada parada entre as idades para todos os grupos experimentais.

No que diz respeito ao tempo de permanência em cada área do campo, pode-se observar que na área central, o grupo veículo apresentou diminuição no tempo de permanência entre o 8º DPN e 14º DPN ( $p < 0,0001$ ), e ambos os grupos de polifenóis apresentaram redução do 8º DPN até o 17º DPN ( $p < 0,0001$ ). Não foram encontradas diferenças no tempo de permanência na área intermediária nas diferentes idades para todos os grupos experimentais. Na área periférica houve aumento no tempo de permanência do 8º DPN até 17º DPN em todos os grupos experimentais ( $p < 0,0001$ ).

Na comparação entre os grupos (diferenças apresentadas na figura 7 e 8), pode-se observar que a distância percorrida foi maior no grupo Resveratrol quando comparados com o grupo Veículo no 17º DPN e 21º DPN (Distância percorrida: DPN17: Veículo =  $12,10 \pm 1,65$ ; Resveratrol =  $19,16 \pm 2,03$ ; DPN21: Veículo =  $18,95 \pm 1,16$ ; Resveratrol =  $24,59 \pm 1,99$ ; em metros  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 7A). A energia cinética foi maior nos animais do grupo Resveratrol em relação aos animais do grupo Kaempferol no 60º DPN (Energia cinética: Kaempferol =  $1,58 \pm 0,12$ ; Resveratrol =  $1,88 \pm 0,14$ ; em milíjoule  $p < 0,01$ ) (Figura 7C).

Em relação à potência média produzida, foi observado aumento no 21º DPN e 60º DPN no grupo resveratrol em comparação aos grupos veículo e kaempferol (Potência média: DPN21: Veículo =  $0,00122 \pm 0,00010$ ; Kaempferol =  $0,00120 \pm 0,00012$ ; Resveratrol =  $0,00426 \pm 0,00092$ ; DPN60: Veículo =  $0,00792 \pm 0,00063$ ; Kaempferol =  $0,00810 \pm 0,00065$ ; Resveratrol =  $0,02398 \pm 0,00396$ ; em m/Watts  $p < 0,05$ ;  $p < 0,0001$ ) (Figura 7D). O tempo de imobilidade foi menor nos animais do grupo resveratrol em relação aos animais do grupo veículo apenas no 17º DPN (Tempo de imobilidade: DPN17: Veículo =  $135,10 \pm 13,74$ ; Resveratrol =  $101,70 \pm 9,73$ ; em segundos  $p < 0,05$ ) (Figura 7E).

O número de paradas foi menor no grupo resveratrol quando comparado com os grupos veículo e kaempferol no 8º DPN e 14º DPN (Número de paradas: DPN8: Veículo =  $26,36 \pm 1,55$ ; Kaempferol =  $27,50 \pm 1,14$ ; Resveratrol =  $20,95 \pm 2,22$ ; DPN14: Veículo =  $27,05 \pm 1,44$ ; Kaempferol =  $25,10 \pm 1,43$ ; Resveratrol =  $20,26 \pm 1,33$ ; em número  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ) (Figura 8F). Quanto ao tempo de permanência em cada área do campo aberto, o grupo resveratrol apresentou maior tempo de permanência na área central e menor tempo de permanência na área intermediária em relação ao grupo kaempferol no 8º DPN (Área central: DPN8: Kaempferol =  $190,20 \pm 18,94$ ; Resveratrol =  $237,70 \pm 21,65$ ; em segundos  $p < 0,01$ ; Área intermediária: DPN8: Kaempferol =  $50,06 \pm 11,61$ ; Resveratrol =  $24,10 \pm 11,39$ ; em segundos  $p < 0,05$ ) (Figura 8 A e B). Não foi observada diferença entre os grupos experimentais na velocidade média, na relação tempo de imobilidade/número de paradas e no tempo de permanência na área periférica.

Figura 7- Efeito dos polifenóis sobre os parâmetros da atividade locomotora.

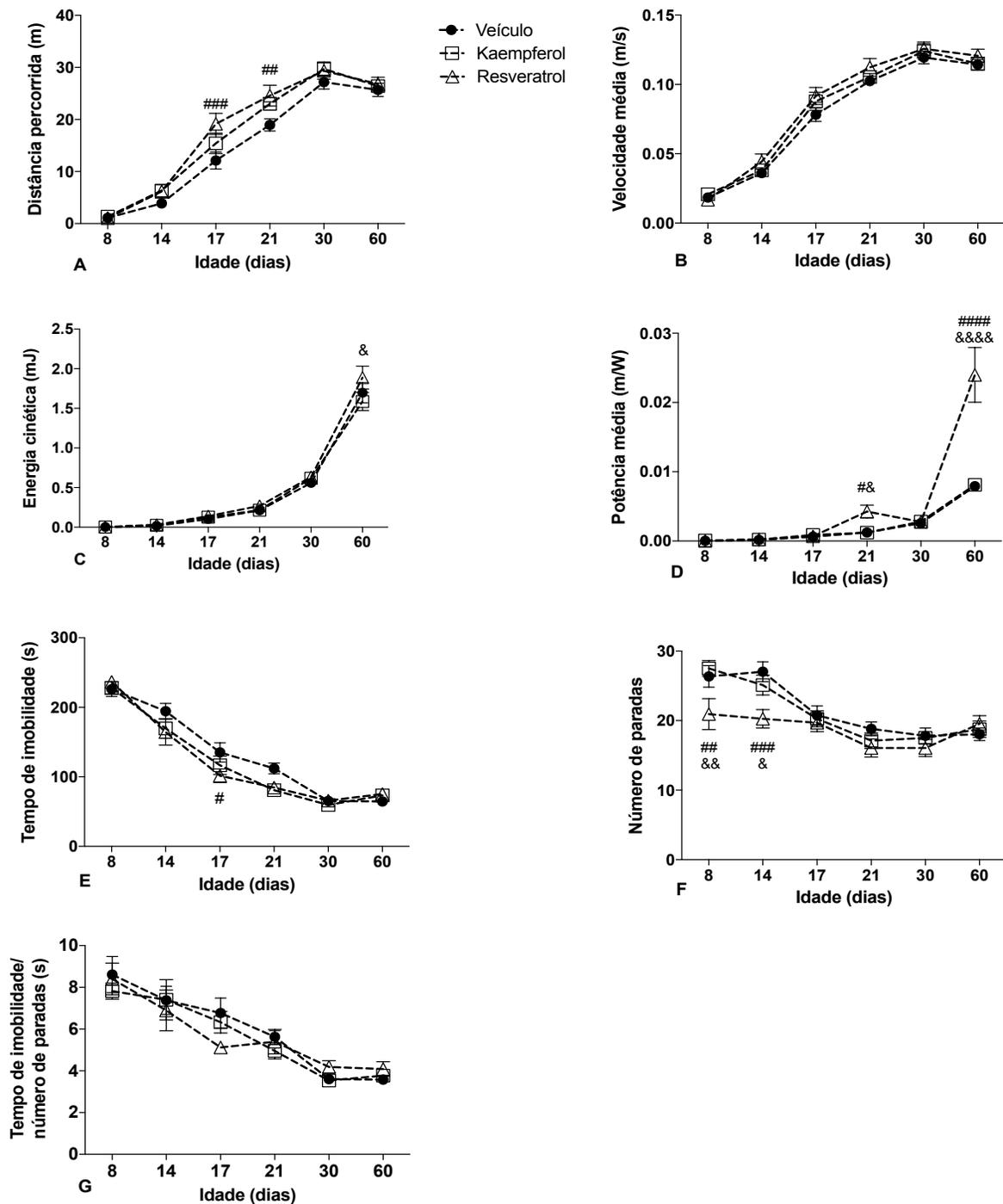


Figura 7 - Efeito dos polifenóis sobre os parâmetros da atividade locomotora. A prole de ratos no 8º, 14º, 17º, 21º, 30º, 60º dia pós-natal foram avaliados em campo aberto durante 5 minutos. Distância percorrida (A), velocidade média (B), energia cinética (C), potência média (D), tempo de imobilidade (E), número de paradas (F), tempo de imobilidade/número de paradas (G). Grupos experimentais: Veículo (n=18-22); Kaempferol (n=17-25); Resveratrol (n=15-19). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste two way ANOVA medidas repetidas, seguido do pós-teste Tukey; # $P$ <0,05; ## $P$ <0,01, ### $P$ <0,001, #### $P$ <0,0001 Resveratrol vs. Veículo; & $P$ <0,05; && $P$ <0,01 Resveratrol vs. Kaempferol.

Figura 8 - Efeitos dos polifenóis sobre o tempo de permanência em cada área do campo aberto.

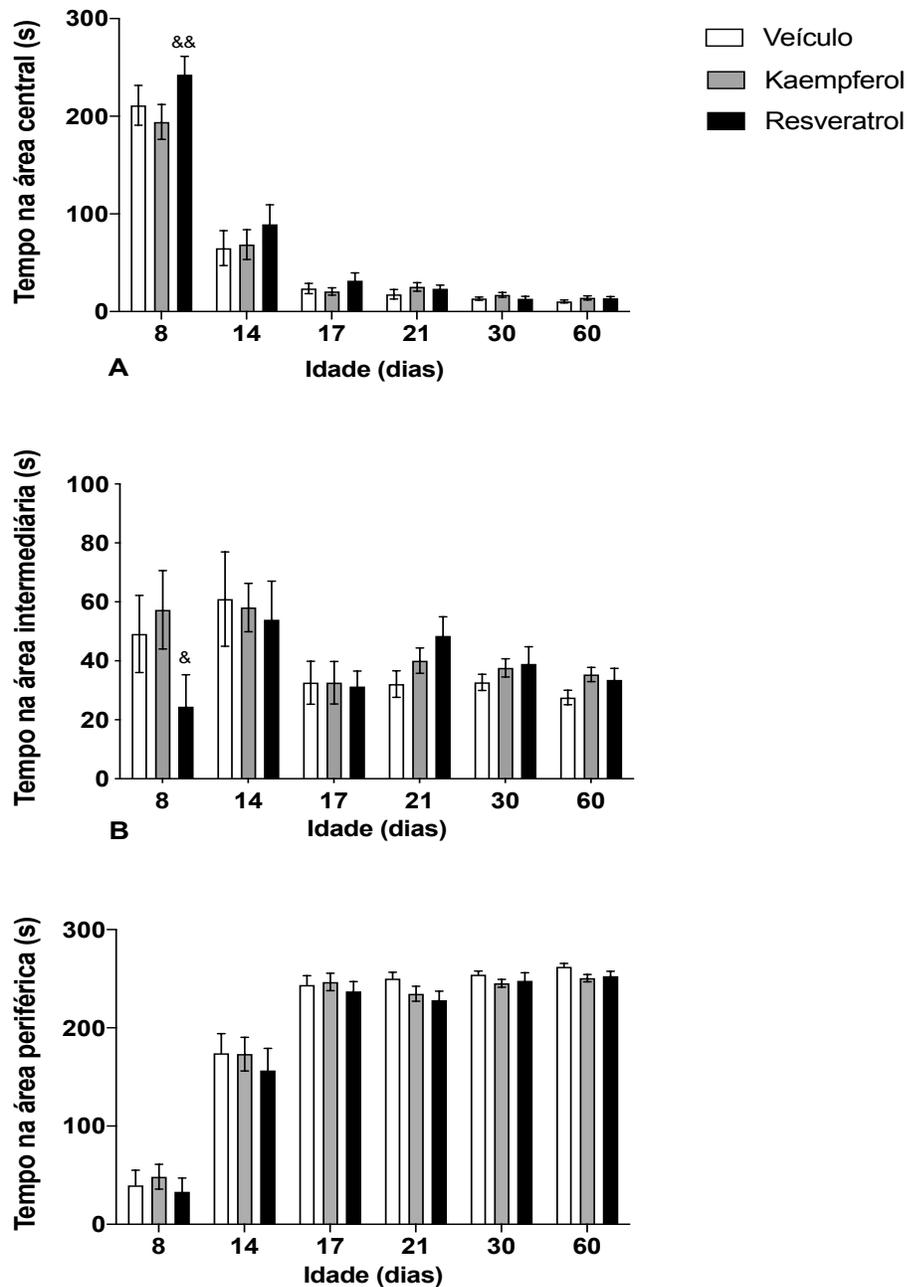


Figura 8 - Efeitos dos polifenóis sobre o tempo de permanência em cada área do campo aberto. A prole de ratos no 8º, 14º, 17º, 21º, 30º e 60º dia pós-natal foram avaliados em campo aberto durante 5 minutos. Tempo de permanência na área central (A), tempo de permanência na área intermediária (B) tempo de permanência na área periférica (C). Grupos experimentais: Veículo (n=18-22); Kaempferol (n=17-25); Resveratrol (n=15-19). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *two way* ANOVA medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey; <sup>&</sup> $P < 0,05$ ; <sup>&&</sup> $P < 0,01$  Resveratrol vs. Kaempferol.

## 6.2 ARTIGO ORIGINAL 2 - “REPERCUSSÕES DA ADMINISTRAÇÃO NEONATAL DE KAEMPFEROL OU RESVERATROL NA ATIVIDADE LOCOMOTORA, COMPORTAMENTO ALIMENTAR, PERFIL BIOQUÍMICO E FLEXIBILIDADE METABÓLICA MUSCULAR DE RATOS MACHOS”

### 6.2.1 Crescimento somático dos animais após o tratamento com polifenóis.

Serão apresentados os dados de acordo ao tratamento com polifenóis e ao status nutricional, visto que, a partir do desmame os animais foram subdivididos em grupo alimentado e grupo jejum de 24 horas.

O peso corporal e o eixo longitudinal continuaram sendo avaliados após o desmame a cada sete dias até os 63 dias de idade. Ambos os parâmetros não mostraram diferenças entre os grupos nas idades avaliadas (Figura 1A e B).

Figura 1 - Evolução do peso corporal e crescimento dos animais após o tratamento com polifenóis.

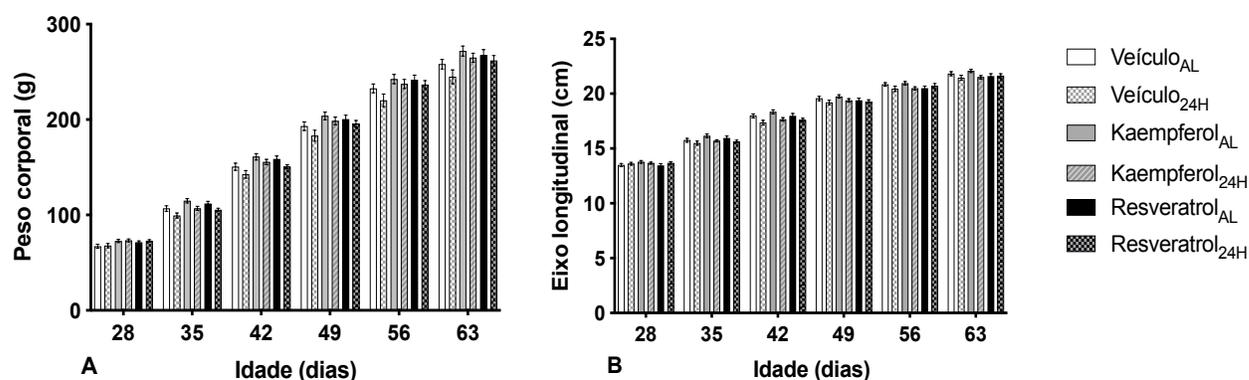


Figura 1 - Peso corporal e eixo-longitudinal de ratos machos após o tratamento com polifenóis. Peso corporal (A), eixo-longitudinal (B). Status nutricional: Alimentado (AL); Jejum de 24 horas (24H). Grupos experimentais: Veículo<sub>AL</sub> (n= 22-23); Veículo<sub>24H</sub> (n= 17-19); Kaempferol<sub>AL</sub> (n= 23-24); Kaempferol<sub>24H</sub> (n= 20); Resveratrol<sub>AL</sub> (n= 20-21); Resveratrol<sub>24H</sub> (n= 20-21). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste two way ANOVA medidas repetidas (A e B), seguido do pós-teste de Tukey.

### 6.2.2 Avaliação do índice de massa corporal (IMC) e índice de Lee

Aos 63 dias de idade, o ANOVA two-way não mostrou efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 124)} = 1,465$ ;  $P=0,2351$ ], status nutricional [ $F_{(1, 124)} = 0,04845$ ;  $P=0,8262$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 124)} = 0,2736$ ;  $P=0,7611$ ] no IMC. Da mesma forma, não houve

efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 123)} = 0,7352$ ;  $P=0,4815$ ], status nutricional [ $F_{(1, 123)} = 1,548$ ;  $P=0,2158$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 123)} = 0,4432$ ;  $P=0,6430$ ] no Índice de Lee. A análise do pós-teste não mostrou diferenças entre os grupos experimentais (Figura 2A e B).

Figura 2 - Índice de massa corporal e índice de Lee de ratos machos.

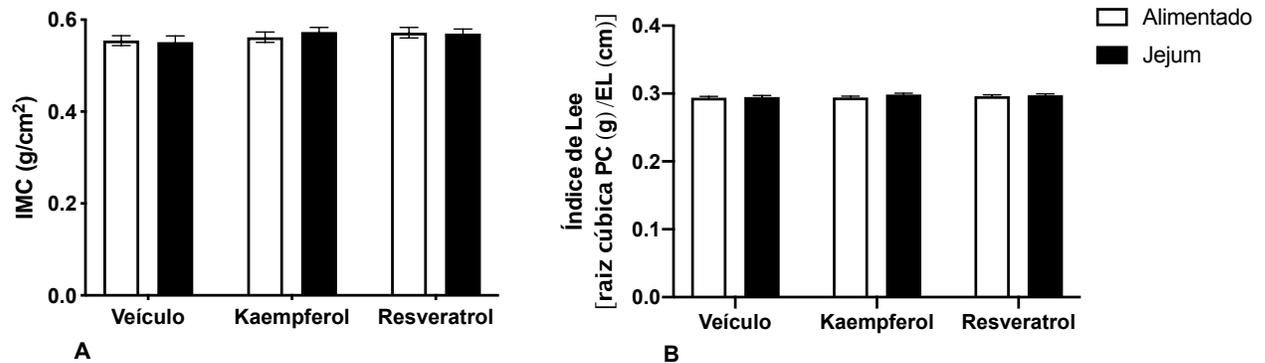


Figura 2 - Índice de massa corporal e índice de Lee de ratos machos. Índice de massa corporal (A), Índice de Lee (B). Grupos experimentais: Veículo<sub>AL</sub> (n= 24); Veículo<sub>24H</sub> (n= 19); Kaempferol<sub>AL</sub> (n= 25); Kaempferol<sub>24H</sub> (n= 20); Resveratrol<sub>AL</sub> (n= 20-21); Resveratrol<sub>24H</sub> (n= 21). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *two-way* ANOVA medidas repetidas (A e B), seguido do pós-teste de Tukey.

### 6.2.3 Efeito do jejum de 24 horas na variação de peso corporal

Após jejum de 24 horas, não observamos diferenças na perda de peso entre os grupos experimentais aos 30, 60 e 70 dias de idade (Figura 3A, B e C).

Figura 3 - Efeito do jejum de 24 horas na variação de peso corporal dos animais aos 30, 60 e 70 dias de idade.

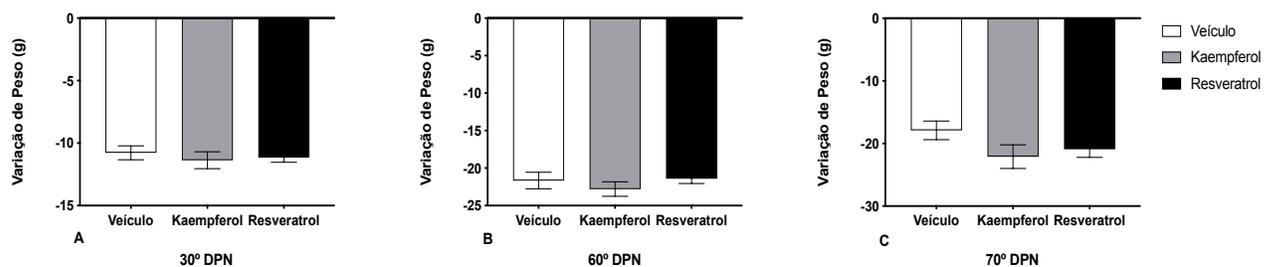


Figura 3 - Variação de peso corporal dos animais com 30, 60 e 70 dias de idade após jejum de 24 horas. Variação de peso corporal no 30 DPN (A), 60 DPN (B) e 70 DPN (C). Grupos experimentais: Veículo (n= 5-13); Kaempferol (n= 7-16); Resveratrol (n= 8-18). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *one way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey.

### 6.2.4 Consumo alimentar relativo diário médio de ratos machos após o desmame

O consumo alimentar relativo médio foi mensurado diariamente em dois períodos. No período do 24° ao 29° DPN, o ANOVA two-way não mostrou influência dos polifenóis [ $F_{(2, 118)} = 0,07549$ ;  $P=0,9273$ ], status nutricional [ $F_{(1, 118)} = 0,05949$ ;  $P=0,8077$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 118)} = 0,8562$ ;  $P=0,4274$ ] no consumo alimentar. Da mesma forma, no período do 54° ao 59° DPN, não houve influência dos polifenóis [ $F_{(2, 119)} = 0,08537$ ;  $P=0,9182$ ], status nutricional [ $F_{(1, 119)} = 0,2696$ ;  $P=0,6045$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 119)} = 0,04567$ ;  $P=0,9554$ ] no consumo alimentar. Não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais em ambos os períodos de avaliação (Figura 4A e B).

Figura 4 - Consumo alimentar relativo diário médio de ratos machos pós-desmame.

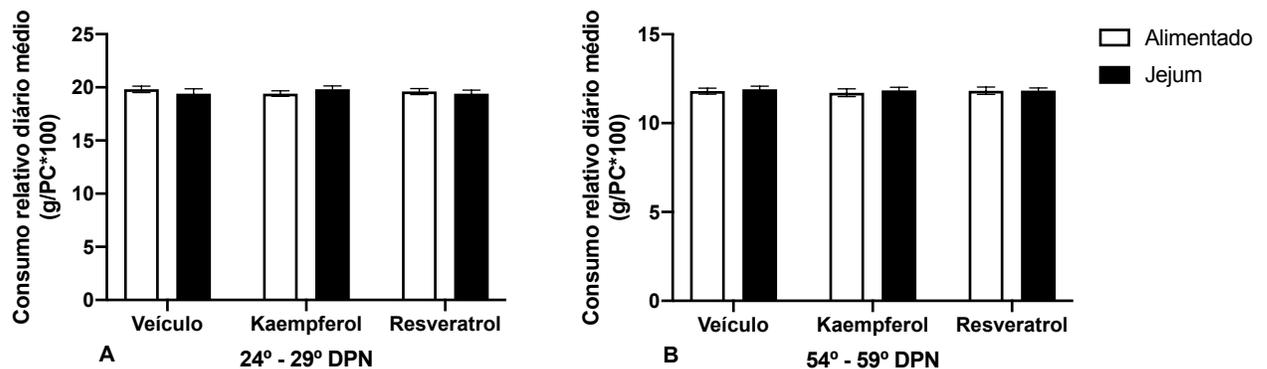


Figura 4 - Consumo alimentar relativo diário médio de ratos machos pós-desmame. Consumo alimentar relativo do 24° ao 29° DPN (A), Consumo alimentar relativo do 54° ao 59° DPN (B). Status nutricional: Alimentado (AL); Jejum de 24 horas (24H). Grupos experimentais: Veículo<sub>AL</sub> (n= 23); Veículo<sub>24H</sub> (n= 18-19); Kaempferol<sub>AL</sub> (n= 25); Kaempferol<sub>24H</sub> (n= 17-18); Resveratrol<sub>AL</sub> (n= 20-21); Resveratrol<sub>24H</sub> (n= 20-21). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *two-way* ANOVA medidas repetidas (A e B), seguido do pós-teste de Tukey.

### 6.2.5 Efeitos do uso neonatal de polifenóis e do status nutricional (alimentado ou jejum de 24 horas) sobre parâmetros da atividade locomotora em ratos machos com 30 e 60 dias de idade

Parâmetros da atividade locomotora foram avaliados aos 30 e 60 dias de idade nos animais que receberam a manipulação neonatal de polifenóis e que foram

submetidos ou não a jejum de 24 horas antes das avaliações no campo aberto. A seguir são mostrados os dados da avaliação da atividade locomotora durante 15 minutos.

Aos 30 dias de idade, quando analisamos a distância percorrida, o ANOVA two-way mostrou efeito dos polifenóis [ $F_{(1, 130)} = 13,45$ ;  $P=0,0004$ ], mas não houve efeito do status nutricional [ $F_{(2, 130)} = 0,2784$ ;  $P=0,7575$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 130)} = 0,9355$ ;  $P=0,3950$ ]. A velocidade média apresentou efeito do status nutricional [ $F_{(1, 129)} = 9,377$ ,  $P=0,0027$ ], mas não houve efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 129)} = 0,01463$ ;  $P=0,9855$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 129)} = 0,7314$ ;  $P=0,4832$ ]. A energia cinética não foi influenciada pelos polifenóis [ $F_{(2, 127)} = 1,129$ ;  $P=0,3265$ ], status nutricional [ $F_{(1, 127)} = 0,004805$ ;  $P=0,9448$ ] e não houve interação entre os fatores [ $F_{(2, 127)} = 0,4988$ ;  $P=0,6084$ ]. O tempo de imobilidade foi influenciado pelo status nutricional [ $F_{(1, 133)} = 4,355$ ,  $P=0,0388$ ], mas não houve influencia dos polifenóis [ $F_{(2, 133)} = 0,9292$ ;  $P=0,3974$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 133)} = 0,7654$ ;  $P=0,4672$ ]. O número de paradas também foi influenciado pelo status nutricional [ $F_{(1, 137)} = 10,55$ ,  $P=0,0015$ ], mas sem influencia dos polifenóis [ $F_{(2, 137)} = 2,147$ ;  $P=0,1207$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 137)} = 1,740$ ;  $P=0,1794$ ]. Na relação tempo de imobilidade/número de paradas não houve efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 126)} = 2,200$ ;  $P=0,1151$ ], status nutricional [ $F_{(1, 126)} = 0,4901$ ;  $P=0,4852$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 126)} = 0,1834$ ;  $P=0,8327$ ]. A análise do pós-teste mostrou que a distância percorrida foi maior nos animais Veículo<sub>24H</sub> quando comparados com os animais que receberam a mesma manipulação farmacológica, mas em status alimentado ( $p<0,05$ ) (Figura 5A). A potencia média e o número de paras foram menores no grupo Veículo<sub>24H</sub> em relação aos animais que receberam a mesma manipulação farmacológica, mas em status alimentado ( $p<0,05$ , para ambos) (Figuras 5D e F). Não houve diferença entre os grupos experimentais na velocidade média, energia cinética, tempo de imobilidade e na relação tempo de imobilidade/número de paradas (Figuras 5B, C, E e G).

Figura 5 - Efeitos dos polifenóis e do status nutricional sobre os parâmetros da atividade locomotora aos 30 dias de idade.

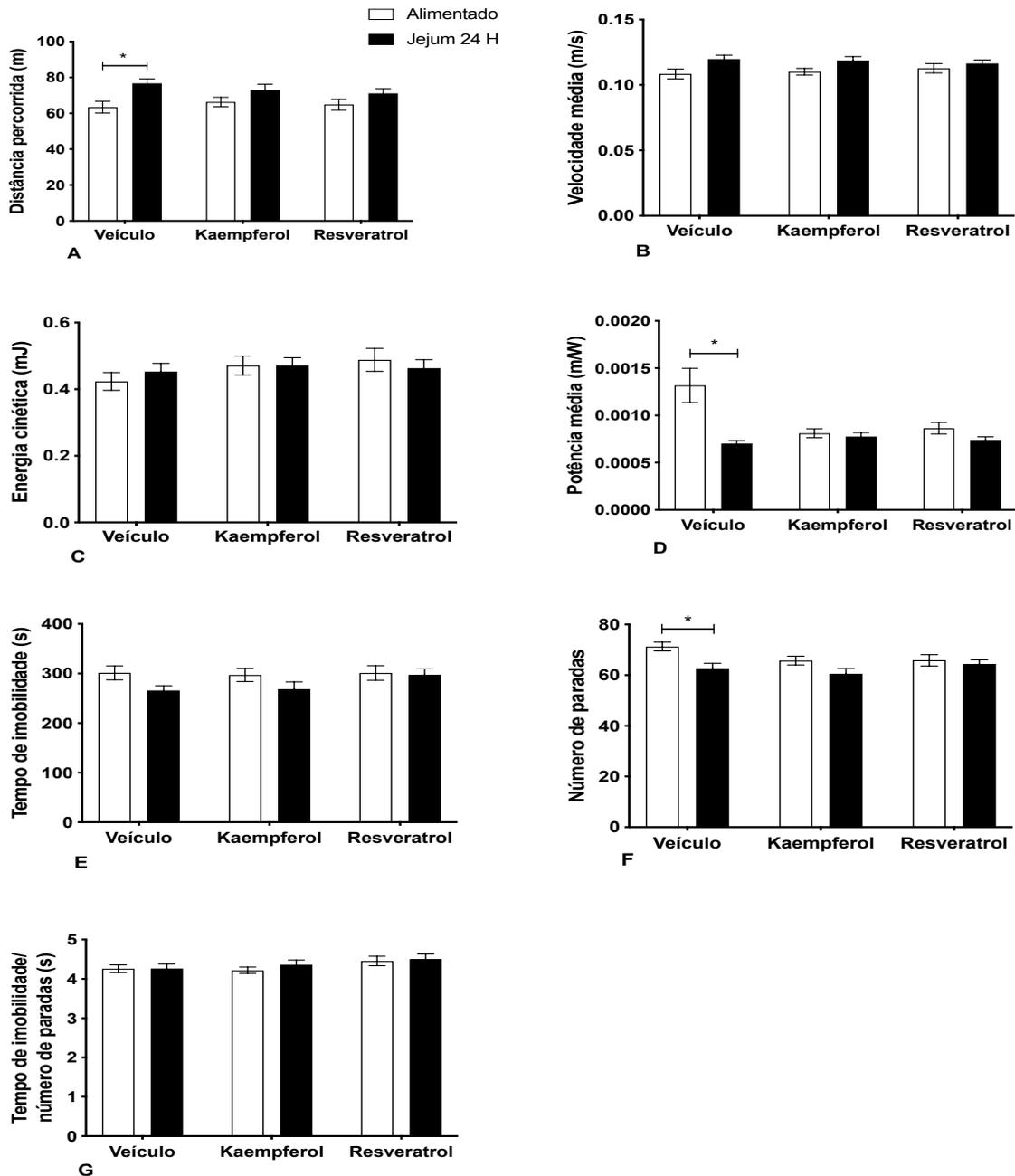


Figura 5 - Efeitos dos polifenóis e do status nutricional sobre os parâmetros da atividade locomotora aos 30 dias de idade. Ratos machos no 30º dia pós-natal foram avaliados em campo aberto durante 15 minutos. Distância percorrida (A), Velocidade média (B), Energia cinética (C), Potência média (D), Tempo de imobilidade (E), Número de paradas (F), Tempo de imobilidade/número de paradas (G). Grupos experimentais: Veículo<sub>AL</sub> (n= 25); Veículo<sub>24H</sub> (n= 24); Kaempferol<sub>AL</sub> (n= 23-25); Kaempferol<sub>24H</sub> (n= 21-22); Resveratrol<sub>AL</sub> (n= 20-21); Resveratrol<sub>24H</sub> (n= 20-22). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste two way ANOVA medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey; \* $P < 0,05$ .

Em relação ao tempo de permanência em cada área do campo aberto, o ANOVA two-way não mostrou efeito de nenhum dos fatores na área central [ $F_{\text{polifenóis}} (2, 125) = 0,6490$ ;  $P=0,5243$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 125) = 0,1324$ ;  $P=0,7166$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 125) = 0,6679$ ;  $P=0,5146$ ], intermediária [ $F_{\text{polifenóis}} (2, 131) = 0,7297$ ;  $P=0,4840$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 131) = 0,8328$ ;  $P=0,3631$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 131) = 2,717$ ;  $P=0,0698$ ] e periférica [ $F_{\text{polifenóis}} (2, 135) = 0,6535$ ;  $P=0,5218$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 135) = 0,5049$ ;  $P=0,4786$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 135) = 2,389$ ;  $P=0,0956$ ]. A análise do pós-teste não mostrou diferença entre os grupos experimentais no tempo de permanência na área central, intermediária e periférica (Figura 6A, B e C).

Figura 6 - Efeitos dos polifenóis e do status nutricional sobre o tempo de permanência em cada área do campo aberto aos 30 dias de idade.

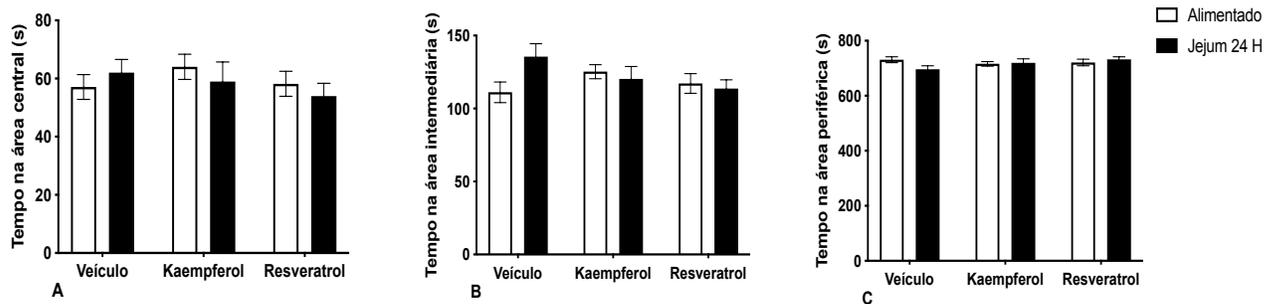


Figura 6 - Efeitos dos polifenóis sobre o tempo de permanência em cada área do campo aberto aos 30 dias de idade. Ratos machos no 30º dia pós-natal foram avaliados em campo aberto durante 15 minutos. Tempo de permanência na área central (A), tempo de permanência na área intermediária (B) tempo de permanência na área periférica (C). Grupos experimentais: Veículo<sub>AL</sub> (n= 25); Veículo<sub>24H</sub> (n= 24); Kaempferol<sub>AL</sub> (n= 23-25); Kaempferol<sub>24H</sub> (n= 21-22); Resveratrol<sub>AL</sub> (n= 20-21); Resveratrol<sub>24H</sub> (n= 20-22). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste two way ANOVA medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey.

Aos 60 dias de idade, a atividade locomotora foi novamente avaliada, o ANOVA two-way mostrou efeito dos polifenóis no tempo de imobilidade [ $F_{(2, 107)} = 3,544$ ;  $P=0,0323$ ], mas não houve efeito do status nutricional [ $F_{(1, 107)} = 0,0003152$ ;  $P=0,9859$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 107)} = 0,02988$ ;  $P=0,9706$ ]. A distância percorrida [ $F_{\text{polifenóis}} (2, 111) = 0,2575$ ;  $P=0,7735$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 111) = 0,2544$ ;  $P=0,6150$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 111) = 0,2251$ ;  $P=0,7988$ ], velocidade média [ $F_{\text{polifenóis}} (2, 116) = 0,05454$ ;  $P=0,9469$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 116) = 0,2343$ ;  $P=0,6292$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 116) = 0,8456$ ;  $P=0,4319$ ], energia cinética [ $F_{\text{polifenóis}} (2, 113) = 0,08723$ ;  $P=0,9165$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 113) = 3,615$ ;  $P=0,0598$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 113) = 0,5418$ ;  $P=0,5832$ ], potência média [ $F_{\text{polifenóis}} (2, 110) = 0,2600$ ;  $P=0,7715$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 110) = 3,093$ ;  $P=0,0814$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 110) = 0,1985$ ;  $P=0,8203$ ], número de paradas

[ $F_{\text{polifenóis}} (2, 114) = 0,7450$ ;  $P=0,4770$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 114) = 0,9921$ ;  $P=0,3213$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 114) = 1,927$ ;  $P=0,1503$ ] e relação tempo de imobilidade/número de paradas [ $F_{\text{polifenóis}} (2, 111) = 2,135$ ;  $P=0,1230$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 111) = 0,6710$ ;  $P=0,4144$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 111) = 0,1928$ ;  $P=0,8249$ ] não foram influenciadas por nenhum fator. A análise do pós-teste não mostrou diferenças entre os grupos experimentais em nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 6A-G).

Figura 7 - Efeitos dos polifenóis e do status nutricional sobre os parâmetros da atividade locomotora aos 60 dias de idade.

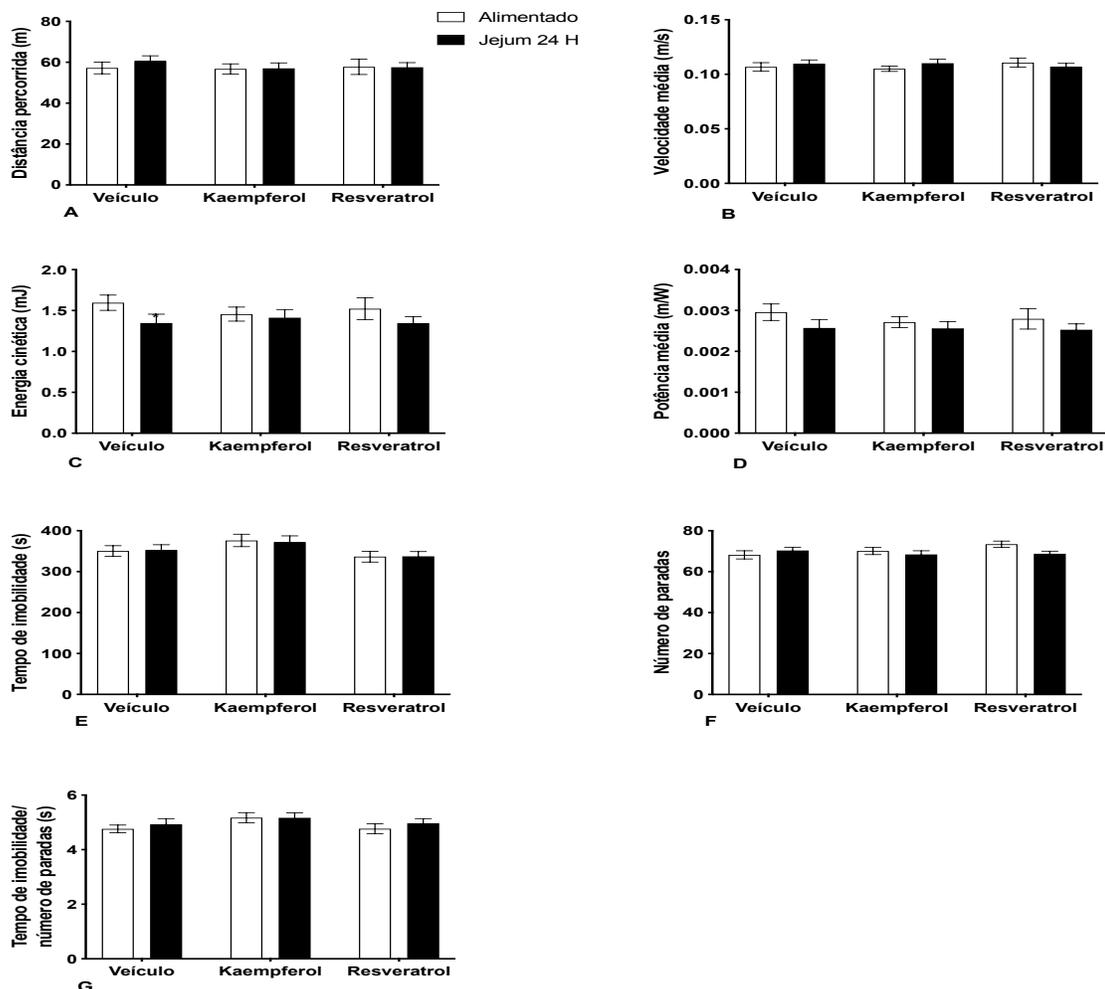


Figura 7 - Efeitos dos polifenóis e do status nutricional sobre os parâmetros da atividade locomotora aos 60 dias de idade. Ratos machos no 60º dia pós-natal foram avaliados em campo aberto durante 15 minutos. Distância percorrida (A), velocidade média (B), energia cinética (C), potência média (D), tempo de imobilidade (E), número de paradas (F), tempo de imobilidade/número de paradas (G). Grupos experimentais: Veículo<sub>AL</sub> (n= 22-23); Veículo<sub>24H</sub> (n= 16-18); Kaempferol<sub>AL</sub> (n= 24); Kaempferol<sub>24H</sub> (n= 17-18); Resveratrol<sub>AL</sub> (n= 19-20); Resveratrol<sub>24H</sub> (n= 18-20). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste two way ANOVA medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey.

Em relação ao tempo de permanência em cada área do campo aberto, o ANOVA two-way não mostrou efeito de nenhum dos fatores na área central [ $F_{\text{polifenóis}} (2, 109) = 0,1263$ ;  $P=0,8815$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 109) = 2,543$ ;  $P=0,1136$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 109) = 1,111$ ;  $P=0,3328$ ], intermediária [ $F_{\text{polifenóis}} (2, 110) = 1,290$ ;  $P=0,2795$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 110) = 1,752$ ;  $P=0,1884$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 110) = 0,4831$ ;  $P=0,6182$ ] e periférica [ $F_{\text{polifenóis}} (2, 116) = 0,6439$ ;  $P=0,5271$ ;  $F_{\text{status nutricional}} (1, 116) = 3,657$ ;  $P=0,0583$ ;  $F_{\text{interação}} (2, 116) = 0,5004$ ;  $P=0,6076$ ]. A análise do pós-teste não mostrou diferença entre os grupos experimentais no tempo de permanência na área central, intermediária e periférica (Figura 8A, B e C).

Figura 8 - Efeitos dos polifenóis e do status nutricional sobre os parâmetros da atividade locomotora aos 60 dias de idade.

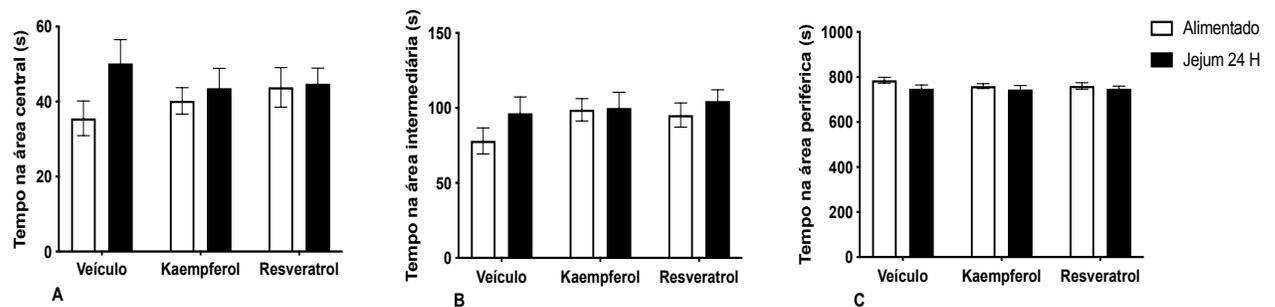


Figura 8 - Efeitos dos polifenóis sobre o tempo de permanência em cada área do campo aberto aos 60 dias de idade. Ratos machos no 60º dia pós-natal foram avaliados em campo aberto durante 15 minutos. Tempo de permanência na área central (A), tempo de permanência na área intermediária (B) tempo de permanência na área periférica (C). Grupos experimentais: Veículo<sub>AL</sub> (n= 22-23); Veículo<sub>24H</sub> (n= 16-18); Kaempferol<sub>AL</sub> (n= 24); Kaempferol<sub>24H</sub> (n= 17-18); Resveratrol<sub>AL</sub> (n= 19-20); Resveratrol<sub>24H</sub> (n= 18-20). Valores expressos em média  $\pm$  EPM. Teste *two way* ANOVA medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey.

### 6.2.6 Efeito do uso neonatal de polifenóis sobre o comportamento alimentar de ratos machos com 30 e 60 dias de idade.

Aos 30 dias de idade, através da SCS foi determinado o ponto de saciedade. O mesmo que foi obtido pelo cruzamento entre o comportamento de alimentação e de descanso. Nos animais tratados com kaempferol e resveratrol durante o período neonatal foi observado antecipação do ponto de saciedade em relação ao grupo veículo (Figuras 9A, B e C).

Figura 9 - Determinação do ponto de saciedade de ratos machos com 30 dias idade que foram submetidos a tratamento neonatal com polifenóis.

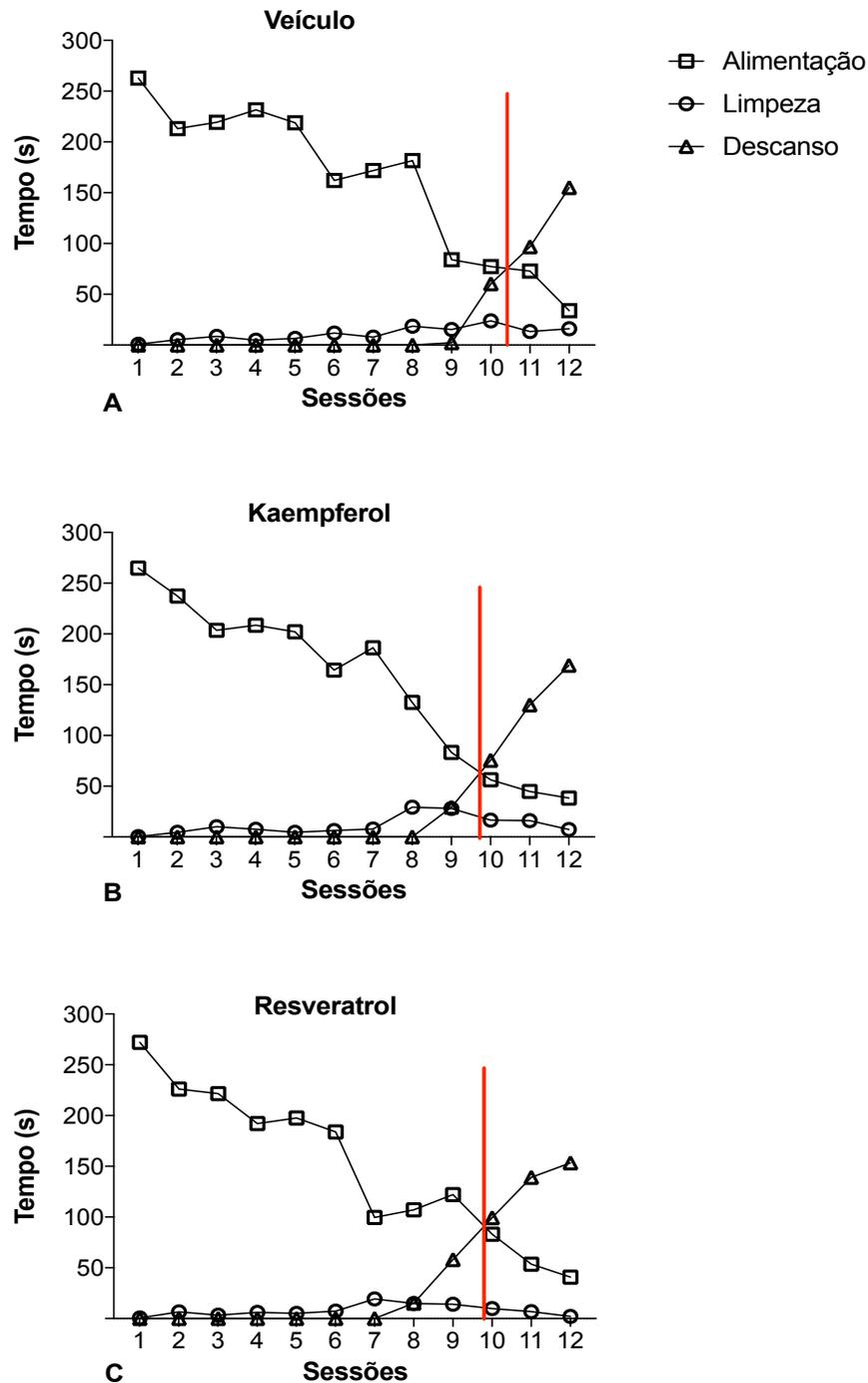


Figura 9 - Determinação do ponto de saciedade avaliado durante a sequência comportamental de saciedade em ratos machos com 30 dias idade que foram submetidos a tratamento neonatal com polifenóis. Os gráficos demonstram os comportamentos de alimentação, limpeza e descanso em cada sessão (5min/sessão). O ponto de saciedade é demonstrado pela linha vertical vermelha indicando o cruzamento entre as linhas que representam o comportamento de alimentação e de descanso. Grupos experimentais: Veículo (n= 25, 14A); Kaempferol (n= 24, 14B); Resveratrol (n= 22, 14C).

A análise da microestrutura da SCS mostrou que a duração e frequência de alimentação foi menor no grupo Resveratrol comparado ao grupo Veículo ( $p < 0,05$ , para ambos) (Tabela 1). Não houve diferença na ingestão relativa, na taxa de alimentação, no tempo de latência para iniciar a alimentação, na duração de alimentação, descanso, limpeza e outras atividades e na frequência de limpeza e de descanso (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros microestruturais da sequencia comportamental de saciedade de ratos machos com 30 dias de idade que foram submetidos a tratamento neonatal com polifenóis.

Parâmetros	Grupos		
	Veículo (n = 20-25)	Kaempferol (n = 20-24)	Resveratrol (n = 19-22)
Ingestão relativa (g/g)	6,90 ± 0,17	6,33 ± 0,20	6,49 ± 0,19
Taxa de alimentação (g/m)	0,21 ± 0,006	0,21 ± 0,006	0,21 ± 0,009
Tempo de latência (s)	11,28 ± 1,63	12,30 ± 1,57	14,36 ± 2,93
Duração da alimentação (s)	1884 ± 48,88	1743 ± 46,01	1660 ± 78,11*
Duração da limpeza (s)	105,20 ± 11,23	125,40 ± 12,64	96,18 ± 7,61
Duração do descanso (s)	315,10 ± 67,31	404,4 ± 80,44	465,2 ± 111
Duração de outras atividades (s)	1225 ± 51,31	1234 ± 73,52	1124 ± 76,36
Frequência de alimentação	10,08 ± 0,91	8,20 ± 0,92	7,10 ± 0,61*
Frequência de limpeza	5,80 ± 0,44	7,00 ± 0,49	5,55 ± 0,44
Frequência de descanso	0,64 ± 0,097	0,61 ± 0,104	0,55 ± 0,108

Nota: Valores expressos em média ± EPM. Teste *one way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey.  $P < 0,05$  vs. Veículo.

Devido ao tempo prolongado de jejum antes da realização da SCS, observamos que alguns animais não apresentaram o comportamento de descanso. Desta forma, avaliamos pelo teste de qui-quadrado se houve influência do uso de polifenol sobre o número de animais que conseguiram apresentar o comportamento de descanso. A análise mostrou que não houve influência do tratamento sobre esse número (Tabela 2).

Tabela 2 - Número de animais que apresentaram ou não o comportamento de descanso durante a sequência comportamental de saciedade.

<b>Grupos</b>	<b>Descansou</b>	<b>Não descansou</b>
Veículo	16	9
Kaempferol	16	8
Resveratrol	12	10

$\chi^2 = 0,7829$ ; gl= 2;  $P=0,6761$

Aos 60 dias de idade, a SCS foi novamente avaliada e não houve diferença no ponto de saciedade entre os grupos Veículo e Kaempferol (Figura 10A e B). Contudo, durante os 60 minutos do teste, o grupo Resveratrol não apresentou cruzamento entre as linhas que representam o comportamento de alimentação e de descanso, indicando que não foi atingido o ponto de saciedade (Figura 10C).

Figura 10 - Determinação do ponto de saciedade de ratos machos com 60 dias idade que foram submetidos a tratamento neonatal com polifenóis.

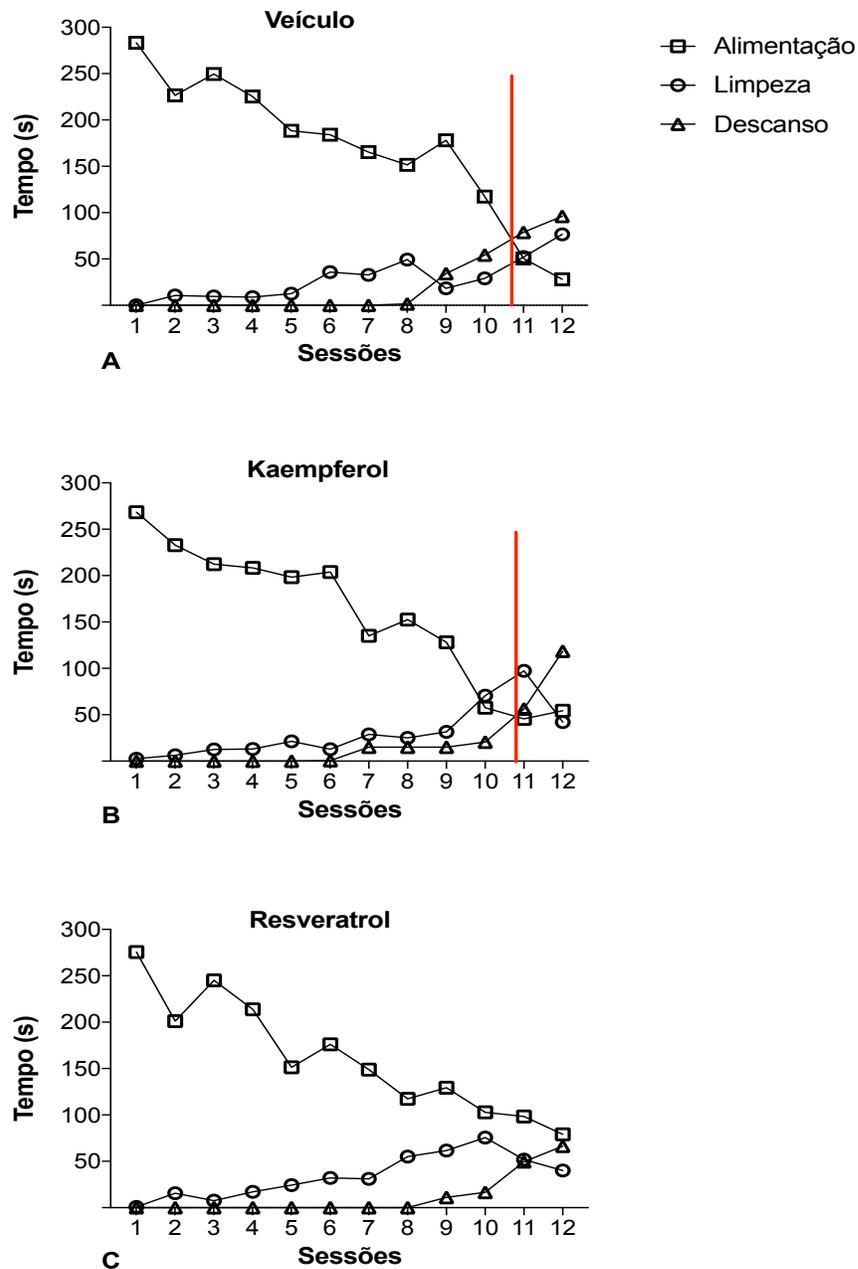


Figura 10 - Determinação do ponto de saciedade avaliado durante a sequência comportamental de saciedade em ratos machos com 60 dias idade que foram submetidos a tratamento neonatal com polifenóis. Os gráficos demonstram os comportamentos de alimentação, limpeza e descanso em cada sessão (5min/sessão). O ponto de saciedade é demonstrado pela linha vertical vermelha indicando o cruzamento entre as linhas que representam o comportamento de alimentação e de descanso. Grupos experimentais: Veículo (n= 25, 15A); Kaempferol (n= 24, 15B); Resveratrol (n= 22, 15C).

Todos os parâmetros da microestrutura não mostraram diferença entre os grupos experimentais (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros microestruturais da sequência comportamental de saciedade de ratos machos com 60 dias de idade que foram submetidos a tratamento neonatal com polifenóis.

Parâmetros	Grupos		
	Veículo (n = 16-19)	Kaempferol (n = 17-23)	Resveratrol (n = 18-21 )
Ingestão relativa (g/g)	4,17 ± 0,18	4,39 ± 0,20	4,06 ± 0,17
Taxa de alimentação (g/m)	0,12 ± 0,006	0,14 ± 0,005	0,13 ± 0,004
Tempo de latência (s)	9,37 ± 1,59	12,00 ± 2,11	11,14 ± 1,66
Duração da alimentação (s)	2126 ± 82,74	1939 ± 72,51	1938 ± 71,73
Duração da limpeza (s)	227,30 ± 33,13	367,90 ± 43,33	322,80 ± 45,25
Duração do descanso (s)	265,40 ± 100,20	241,90 ± 96,87	143,60 ± 66,52
Duração de outras atividades (s)	937,10 ± 60,32	1130 ± 54,87	1097 ± 54,65
Frequência de alimentação	7,50 ± 0,92	7,72 ± 0,76	8,50 ± 0,89
Frequência de limpeza	7,35 ± 0,69	8,10 ± 0,85	7,56 ± 0,82
Frequência de descanso	0,47 ± 0,12	0,40 ± 0,11	0,24 ± 0,09

Nota: Valores expressos em média ± EPM. Teste *one way* ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey.

Não foi observada influência do tratamento com polifenol sobre o número de animais que conseguiram ou não atingir o descanso durante a análise da SCS (Tabela 4).

Tabela 4 - Número de animais que apresentaram ou não o comportamento de descanso durante a sequência comportamental de saciedade.

Grupos	Descansou	Não descansou
Veículo	9	10
Kaempferol	8	12
Resveratrol	5	16

$\chi^2 = 2,528$ ; gl= 2;  $P=0,2826$

### 6.2.7 Efeito do uso neonatal de polifenóis e do status nutricional (alimentado ou jejum de 24 horas) sobre o perfil bioquímico e peso relativo de órgãos e tecidos de ratos machos com 70 dias de idade

Após a eutanásia, aos 70 dias de idade, o perfil bioquímico foi determinado no soro pelas análises de glicose, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL e albumina. Para a glicose o ANOVA two-way mostrou efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 51)} = 3,318$ ;  $P=0,0442$ ] e do status nutricional [ $F_{(1, 51)} = 140,5$ ;  $P<0,0001$ ], mas não houve efeito da interação entre os fatores [ $F_{(2, 51)} = 0,07347$ ;  $P=0,9293$ ]. Apenas houve efeito do status nutricional [ $F_{(1, 46)} = 182,2$ ;  $P<0,0001$ ] para os triglicerídeos, mas não houve efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 46)} = 2,261$ ;  $P=0,1157$ ] nem da interação entre os fatores [ $F_{(2, 46)} = 2,108$ ;  $P=0,1330$ ]. O colesterol total teve influencia dos polifenóis [ $F_{(2, 52)} = 7,280$ ;  $P=0,0016$ ], do status nutricional [ $F_{(1, 52)} = 8,051$ ;  $P=0,0065$ ] e houve interação entre os fatores [ $F_{(2, 52)} = 4,362$ ;  $P=0,0177$ ]. Houve efeito do status nutricional [ $F_{(1, 51)} = 9,819$ ;  $P=0,0029$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 51)} = 4,868$ ;  $P=0,0116$ ], mas sem efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 51)} = 1,963$ ;  $P=0,1509$ ] para o colesterol HDL. A albumina não teve influencia dos polifenóis [ $F_{(2, 51)} = 1,114$ ;  $P=0,3360$ ], do status nutricional [ $F_{(1, 51)} = 0,8118$ ;  $P=0,3718$ ] e não houve interação entre os fatores [ $F_{(2, 51)} = 1,698$ ;  $P=0,1932$ ]. O pós-teste mostrou que os níveis séricos de glicose e triglicerídeos foram menores nos animais veículo, kaempferol e resveratrol submetidos a jejum de 24 horas em relação a seus pares em estado alimentado ( $p<0,0001$ , para todos os grupos). O colesterol total foi menor no grupo Veículo<sub>24H</sub> em relação a seu mesmo grupo de tratamento, mas em estado alimentado. Os animais dos grupos Kaempferol<sub>24H</sub> e Resveratrol<sub>24H</sub> apresentaram níveis maiores de colesterol total que o grupo Veículo<sub>24H</sub> (Kaempferol<sub>24H</sub>:  $p<0,001$ ; Resveratrol<sub>24H</sub>:  $p<0,05$ ). O grupo Resveratrol<sub>24H</sub> teve maior nível sérico de colesterol HDL em relação ao seu mesmo grupo de tratamento, mas em estado alimentado ( $p<0,001$ ). A albumina não apresentou diferença entre os grupos (Tabela 5).

Em relação ao peso relativo de órgãos e de tecidos, o ANOVA two-way mostrou efeito do status nutricional [ $F_{(1, 84)} = 26,44$ ;  $P<0,0001$ ], mas sem efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 84)} = 1,779$ ;  $P=0,1751$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 84)} = 0,7418$ ;  $P=0,4793$ ] para o encéfalo. Da mesma forma, o peso do fígado apresentou efeito apenas do status nutricional [ $F_{(1, 85)} = 127,7$ ;  $P<0,0001$ ], mas sem efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 85)} = 0,1353$ ;

P=0,8736] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 85)} = 0,2362$ ; P=0,7902]. Para os músculos avaliados, o ANOVA two-way apenas mostrou influência do status nutricional, sem influencia dos polifenóis e da interação entre os fatores. Sóleo [ $F_{\text{status nutricional (1, 81)}} = 5,574$ ; P=0,0206;  $F_{\text{polifenóis (2, 81)}} = 2,149$ ; P=0,1232;  $F_{\text{interação (2, 81)}} = 0,1928$ ; P=0,8250], EDL [ $F_{\text{status nutricional (1, 83)}} = 15,90$ ; P=0,0001;  $F_{\text{polifenóis (2, 83)}} = 0,2328$ ; P=0,7928;  $F_{\text{interação (2, 83)}} = 0,1471$ ; P=0,8635] e gastrocnêmio [ $F_{\text{status nutricional (1, 85)}} = 4,280$ ; P=0,0416;  $F_{\text{polifenóis (2, 85)}} = 1,673$ ; P=0,1938;  $F_{\text{interação (2, 85)}} = 0,1303$ ; P=0,8780]. O somatório dos três músculos (músculo total) não teve efeito do status nutricional [ $F_{(1, 86)} = 3,849$ ; P=0,0530], dos polifenóis [ $F_{(2, 86)} = 1,278$ ; P=0,2839] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 86)} = 0,2423$ ; P=0,7854]. O tecido adiposo epididimal teve efeito do status nutricional [ $F_{(1, 74)} = 21,10$ ; P<0,0001], mas não teve efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 74)} = 0,6698$ ; P=0,5149] nem da interação entre os fatores [ $F_{(2, 74)} = 1,286$ ; P=0,2824]. O tecido adiposo retroperitoneal foi influenciado pelos polifenóis [ $F_{(2, 74)} = 3,935$ ; P=0,0238], mas não foi influenciado pelo status nutricional [ $F_{(1, 74)} = 0,1588$ ; P=0,6914] e pela interação entre os fatores [ $F_{(2, 74)} = 0,3743$ ; P=0,6890]. O tecido adiposo mesentérico não teve efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 79)} = 0,9912$ ; P=0,3757], do status nutricional [ $F_{(1, 79)} = 2,453$ ; P=0,1213] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 79)} = 1,787$ ; P=0,1741]. O tecido adiposo abdominal (somatório dos três tecidos adiposos) foi influenciado apenas pelo status nutricional [ $F_{(1, 78)} = 5,395$ ; P=0,0228], mas não foi influenciado pelos polifenóis [ $F_{(2, 78)} = 1,614$ ; P=0,2057] nem pela interação entre os fatores [ $F_{(2, 78)} = 0,6367$ ; P=0,5317]. O tamanho da tíbia teve efeito do status nutricional [ $F_{(1, 86)} = 5,248$ ; P=0,0244], mas não teve efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 86)} = 0,5041$ ; P=0,6058] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 86)} = 0,6422$ ; P=0,5287].

O pós-teste mostrou que o peso relativo do encéfalo foi maior no grupo Veículo<sub>24H</sub> em relação ao grupo Veículo<sub>AL</sub> (p<0,01). O peso relativo do fígado foi menor nos grupos Veículo<sub>24H</sub>, Kaempferol<sub>24H</sub> e Resveratrol<sub>24H</sub> em relação a seus pares alimentados (p<0,0001, para todos os grupos). Não houve diferença no peso relativo dos músculos sóleo, EDL e gastrocnêmio entre os grupos experimentais, assim como do peso do somatório muscular. O peso relativo do tecido adiposo epididimal foi maior nos grupos Kaempferol<sub>24H</sub> e Resveratrol<sub>24H</sub> em relação a seus mesmos grupos de tratamento, mas em estado alimentado (Kaempferol<sub>24H</sub>: p<0,01; Resveratrol<sub>24H</sub>: p<0,05).

Não houve diferença no peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal e mesentérico entre os grupos experimentais, assim como do tecido adiposo abdominal. O tamanho da tibia não foi diferente entre os grupos experimentais (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfil bioquímico e peso relativo de órgãos e tecidos de ratos machos aos 70 dias de idade.

Parâmetros	Grupos					
	Veículo		Kaempferol		Resveratrol	
	Alimentado (n = 9-14)	Jejum 24H (n = 9-13)	Alimentado (n = 8-14)	Jejum 24H (n = 9-16)	Alimentado (n = 7-16)	Jejum 24H (n = 7-19)
Glicose (mg/dL)	125,10 ± 6,88	74,89 ± 3,19 <sup>***</sup>	132,40 ± 8,40	85,93 ± 1,38 <sup>****</sup>	137,00 ± 4,25	87,71 ± 3,38 <sup>****</sup>
Triglicerídeos (mg/dL)	90,58 ± 6,30	38,27 ± 2,58 <sup>****</sup>	109,20 ± 7,25	39,50 ± 2,44 <sup>****</sup>	90,76 ± 8,34	40,34 ± 3,79 <sup>****</sup>
Colesterol total (mg/dL)	55,96 ± 2,11	44,15 ± 1,49 <sup>**</sup>	57,61 ± 2,32	58,27 ± 2,02 <sup>§§§</sup>	57,76 ± 1,72	54,01 ± 2,94 <sup>&amp;</sup>
Colesterol HDL (mg/dL)	34,61 ± 1,58	34,71 ± 0,80	36,56 ± 1,61	39,15 ± 1,56	31,25 ± 1,37	40,78 ± 2,16 <sup>***</sup>
Albumina (mg/dL)	2,25 ± 0,12	2,37 ± 0,08	2,30 ± 0,08	2,48 ± 0,09	2,32 ± 0,05	2,20 ± 0,03
Encéfalo (%)	0,63 ± 0,01	0,71 ± 0,02 <sup>**</sup>	0,61 ± 0,01	0,67 ± 0,01	0,64 ± 0,01	0,68 ± 0,01
Fígado (%)	4,07 ± 0,08	3,28 ± 0,09 <sup>****</sup>	4,11 ± 0,09	3,31 ± 0,07 <sup>****</sup>	4,02 ± 0,07	3,32 ± 0,09 <sup>****</sup>
Sóleo (%)	0,041 ± 0,0009	0,044 ± 0,0007	0,043 ± 0,0010	0,045 ± 0,0009	0,043 ± 0,001	0,045 ± 0,0008
EDL (%)	0,037 ± 0,0015	0,042 ± 0,0012	0,037 ± 0,0014	0,041 ± 0,0008	0,039 ± 0,013	0,042 ± 0,0007
Gastrocnêmio (%)	0,48 ± 0,009	0,49 ± 0,008	0,49 ± 0,012	0,51 ± 0,007	0,48 ± 0,009	0,49 ± 0,009
Músculo total (%)	0,56 ± 0,009	0,57 ± 0,008	0,57 ± 0,013	0,59 ± 0,008	0,57 ± 0,013	0,58 ± 0,009
Tecido adiposo epidídimal (%)	1,53 ± 0,05	1,66 ± 0,07	1,40 ± 0,02	1,75 ± 0,07 <sup>**</sup>	1,52 ± 0,06	1,77 ± 0,06 <sup>*</sup>
Tecido adiposo restroperitoneal (%)	1,56 ± 0,07	1,59 ± 0,11	1,82 ± 0,11	1,94 ± 0,13	1,83 ± 0,11	1,78 ± 0,08
Tecido adiposo mesentérico	1,10 ± 0,06	1,14 ± 0,06	1,02 ± 0,03	1,24 ± 0,07	1,20 ± 0,08	1,19 ± 0,05
Tecido adiposo abdominal (total)	4,24 ± 0,15	4,40 ± 0,24	4,33 ± 0,18	4,97 ± 0,21	4,45 ± 0,21	4,81 ± 0,19
Tíbia (mm)	32,67 ± 0,23	32,18 ± 0,37	32,96 ± 0,22	32,27 ± 0,11	32,48 ± 0,27	32,31 ± 0,21

Nota: Valores expressos em média ± EPM. Teste *two way* ANOVA medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey.

<sup>\*</sup>  $p < 0,05$ ; <sup>\*\*</sup>  $p < 0,01$ ; <sup>\*\*\*</sup>  $p < 0,001$ ; <sup>\*\*\*\*</sup>  $p < 0,0001$  Jejum 24H vs. Alimentado, entre animais com mesmo tratamento.

<sup>§§§</sup>  $p < 0,001$  Kaempferol<sub>24H</sub> vs. Veículo<sub>24H</sub>

<sup>&</sup>  $p < 0,05$  Resveratrol<sub>24H</sub> vs. Veículo<sub>24H</sub>

### 6.2.8 Polifenóis e resposta de expressão de genes relacionados ao metabolismo muscular

No músculo sóleo, foi avaliada a expressão de genes relacionados ao metabolismo muscular. Para o gene *Bhad* o ANOVA two-way mostrou efeito dos polifenóis [ $F_{(2, 15)} = 19,32$ ;  $P < 0,0001$ ], do status nutricional [ $F_{(1, 15)} = 10,24$ ;  $P = 0,0060$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 15)} = 34,26$ ;  $P < 0,0001$ ]. A expressão do gene *Pdk4* teve influência dos polifenóis [ $F_{(2, 13)} = 6,851$ ;  $P = 0,0093$ ] e da interação entre os fatores [ $F_{(2, 13)} = 4,680$ ;  $P = 0,0294$ ], mas não teve influência do status nutricional [ $F_{(1, 13)} = 4,366$ ;  $P = 0,0569$ ]. A expressão dos genes *Myh7*, *Pgc1a* e *Foxo1* não mostrou influência do status nutricional, dos polifenóis e da interação entre os fatores. *Myh7* [ $F_{\text{status nutricional (1, 16)}} = 0,3700$ ;  $P = 0,5515$ ;  $F_{\text{polifenóis (2, 16)}} = 0,4596$ ;  $P = 0,6396$ ;  $F_{\text{interação (2, 16)}} = 0,3880$ ;  $P = 0,6846$ ], *Pgc1a* [ $F_{\text{status nutricional (1, 14)}} = 0,03059$ ;  $P = 0,8637$ ;  $F_{\text{polifenóis (2, 14)}} = 0,02950$ ;  $P = 0,9710$ ;  $F_{\text{interação (2, 14)}} = 0,02902$ ;  $P = 0,9715$ ] e *FOXO1* [ $F_{\text{status nutricional (1, 17)}} = 0,06818$ ;  $P = 0,7971$ ;  $F_{\text{polifenóis (2, 17)}} = 1,607$ ;  $P = 0,2295$ ;  $F_{\text{interação (2, 17)}} = 0,3606$ ;  $P = 0,7025$ ].

O pós-teste mostrou que a expressão do *Bhad* foi maior no grupo Veículo<sub>24H</sub> em relação ao grupo Veículo<sub>AL</sub> ( $p < 0,0001$ ), menor sua expressão nos grupos Kaempferol<sub>24H</sub> e Resveratrol<sub>24H</sub> em relação ao grupo Veículo<sub>24H</sub> ( $p < 0,0001$ , para ambos grupos). A expressão do gene *Pdk4* foi maior no grupo Resveratrol<sub>24H</sub> em relação aos grupos Resveratrol<sub>AL</sub>, Veículo<sub>24H</sub> e Kaempferol<sub>24H</sub> ( $p < 0,05$ , para todos os grupos). Não houve diferença na expressão de mRNA dos genes *Myh7*, *Pgc1a* e *Foxo1* entre os grupos experimentais (Tabela 6).

Tabela 6 - Expressão de genes relacionados ao metabolismo muscular de ratos machos com 70 dias de idade.

Grupo/ Gene	Veículo	Kaempferol	Resveratrol
<b><i>Myh7</i></b>			
Alimentado	1,000 ± 0,616	0,301 ± 0,185	0,603 ± 0,786
Jejum – 24h	0,778 ± 1,140	0,568 ± 0,277	1,657 ± 0,929
<b><i>Pgc1a</i></b>			
Alimentado	1,000 ± 1,981	0,00001 ± 3,240	0,006 ± 1,461
Jejum – 24h	0,006 ± 3,518	0,004 ± 1,816	0,00008 ± 1,539
<b><i>Bhad</i></b>			
Alimentado	1,000 ± 1,341	13,226 ± 2,901	0,932 ± 3,644
Jejum – 24h	43,271 ± 3,450 <sup>*****</sup>	0,192 ± 4,243 <sup>§§§§</sup>	0,122 ± 1,336 <sup>§§§§</sup>
<b><i>Pdk4</i></b>			
Alimentado	1,000 ± 3,348	0,298 ± 0,872	2,498 ± 1,221

Jejum – 24h	1,079 ± 5,027	0,072 ± 5,546	20,252 ± 3,045 <sup> *&amp;#</sup>
<b>Foxo1</b>			
Alimentado	1,000 ± 2,260	0,312 ± 0,913	3,311 ± 1,151
Jejum – 24h	2,982 ± 2,815	0,021 ± 0,414	2,666 ± 1,731

Nota: Valores expressos em média ± EPM. Teste *two way* ANOVA medidas repetidas, seguido do pós-teste de Tukey.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  Jejum 24H vs. Alimentado, entre animais com mesmo tratamento.

§§§§  $p < 0,0001$  Kaempferol<sub>24H</sub> vs. Veículo<sub>24H</sub>

&  $p < 0,05$ ; &&&&  $p < 0,0001$  Resveratrol<sub>24H</sub> vs. Veículo<sub>24H</sub>

#  $p < 0,05$  Resveratrol<sub>24H</sub> vs. Kaempferol<sub>24H</sub>

## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 ARTIGO ORIGINAL 1 - “EFEITOS DO USO NEONATAL DE POLIFENÓIS NO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO, ATIVIDADE LOCOMOTORA E PERFIL GLICÊMICO DE RATOS”

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do uso neonatal do kaempferol e do resveratrol no desenvolvimento somático, atividade locomotora e perfil glicêmico de ratos machos.

#### 7.1.1 Polifenóis e o crescimento somático e consumo alimentar

Em relação ao desenvolvimento somático, os principais resultados apresentados mostram que o peso corporal dos animais que receberam kaempferol foi maior em relação ao grupo veículo no fim da lactação. Esse aumento também foi observado em filhotes machos provenientes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica e que foram tratados com kaempferol (1mg/kg i.p., por 14 dias) a partir da segunda semana de lactação (CHAVES *et al.*, 2020). Segundo os autores do estudo, o aumento do peso corporal associado a uso de kaempferol poderia estar relacionado com a ação do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e do hormônio do crescimento (GH) (CHAVES *et al.*, 2020), pois ambos modulam o crescimento no período pós-natal (LUPU *et al.*, 2001; VELLOSO, 2008). Sabe-se que esses hormônios influenciam o desempenho do crescimento somático, ativando vias regulatórias para proliferação celular e síntese de proteínas via PI3K/Akt/mTOR, contribuindo assim para o aumento da massa muscular no animal (VELLOSO, 2008). Nossos animais do grupo resveratrol durante o período de lactação não apresentaram diferença no peso corporal. O resveratrol tem demonstrado diminuir os níveis de IGF-1 não apenas em roedores (BAUR *et al.*, 2006), mas também em humanos (BROWN *et al.*, 2010). Homens saudáveis apresentaram diminuição nos níveis de IGF-1 ao ingerir resveratrol na dose de 2,5 g/d durante 29 dias (BROWN *et al.*, 2010). Tanto o kaempferol como o resveratrol não influenciaram na porcentagem de ganho de peso e eixo longitudinal

durante o período de lactação. Sugerindo que durante o período pós-natal inicial o kaempferol é capaz de aumentar o peso corporal restando esclarecer se esse aumento se deve a maior massa gorda ou massa livre de gordura. Embora nossos animais tratados com kaempferol tenham apresentado ganho de peso durante o período de lactação, esse efeito não se manteve a longo prazo, o que pode estar relacionado com a dose usada e o tempo de administração.

Após o desmame, ambos polifenóis não influenciaram o peso corporal, eixo longitudinal, índice de massa corporal (IMC) e o consumo alimentar de nossos animais. Camundongos adultos obesos que receberam kaempferol (0.5 mg/kg i.p.) durante 40 dias mostraram perda de peso corporal significativa, sem alteração na ingestão alimentar média e cumulativa durante o tratamento com kaempferol (ROMERO-JUÁREZ *et al.*, 2023). Da mesma forma, não foi observada diferença significativa na ingestão alimentar relativa de ratos jovens expostos a kaempferol (1mg/kg i.p.) e dieta rica em gordura durante o período neonatal (CHAVES *et al.*, 2020). Contudo, a administração de kaempferol contribuiu para o ganho de peso corporal e de outros parâmetros somáticos avaliados, sem alteração no IMC (CHAVES *et al.*, 2020). Esses efeitos controversos podem estar relacionados com o tempo de uso dos polifenóis (MONTERO *et al.*, 2014). Montero *et al.* (2014) observaram diminuição significativa no consumo alimentar de camundongos alimentados com dieta hipercalórica suplementada com kaempferol (50 mg/kg-dieta e 250 mg/kg-dieta) e resveratrol (250 mg/kg-dieta). No entanto, ambos polifenóis foram capazes de diminuir o consumo alimentar apenas após período longo de tratamento (13 a 21 meses) (MONTERO *et al.*, 2014). Além disso, sabe-se que os polifenóis apresentam baixa biodisponibilidade oral devido a vários fatores: interação com a matriz alimentar, processos metabólicos mediados pelo fígado (metabolismo das fases I e II), intestino e microbiota (MANACH *et al.*, 2004; LUCA *et al.*, 2020; DI LORENZO *et al.*, 2021).

Em relação à farmacocinética do kaempferol, foi observado em ratos que após a administração oral, o tempo de concentração plasmática máxima ( $t_{max}$ ) foi de 1-1,5 horas seguido por um declínio constante até 6 horas (BARVE *et al.*, 2009). Enquanto que, após a administração intravenosa (i.v.), a concentração plasmática de kaempferol caiu para 50% ( $t_{1/2}$ ) em aproximadamente 3-4 horas, seguida por um declínio constante

até ~12 horas (BARVE *et al.*, 2009). Da mesma forma, estudos mostram que a absorção oral do resveratrol em humanos é aproximadamente de 75% (WALLE *et al.*, 2004; WALLE, 2011), mas é extensamente metabolizado no intestino e no fígado e rapidamente eliminado pela urina e, portanto, apresenta baixa biodisponibilidade (WALLE *et al.*, 2004; WALLE, 2011; CHIMENTO *et al.*, 2019). Em humanos, foi observado que após a administração oral de várias doses de resveratrol, o tempo de concentração plasmática máxima ( $t_{max}$ ) foi de 1 hora e com meia-vida plasmática ( $t_{1/2}$ ) entre 4,7-9,7 horas (BROWN *et al.*, 2010). A meia-vida plasmática ( $t_{1/2}$ ) em indivíduos saudáveis, após a administração i.v. de  $^{14}C$ -resveratrol (0,2 mg) foi de 11,4 horas (WALLE *et al.*, 2004). Embora a administração intravenosa possa levar a maior concentração plasmática de kaempferol e resveratrol, a administração intraperitoneal (i.p.) foi escolhida por ser mais adequada para o tratamento crônico. Além disso, a via de administração intraperitoneal foi escolhida para aumentar a biodisponibilidade de ambos os polifenóis, que é limitada quando administrados por via oral (WALLE *et al.*, 2004; BARVE *et al.*, 2009; BROWN *et al.*, 2010).

### **7.1.2 Polifenóis e a resposta glicêmica**

Outro efeito evidenciado em estudos com animais, é o controle da glicemia que alguns polifenóis possuem, sugerindo que os polifenóis podem ser uma terapia dietética para a prevenção e tratamento do diabetes tipo 2 (HANHINEVA *et al.*, 2010; ALKHALIDY *et al.*, 2015; KIM, KEOGH e CLIFTON, 2016; ALKHALIDY *et al.*, 2018). Nesse sentido, os polifenóis atuam no controle da glicemia através dos seguintes mecanismos: inibição da  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glicosidase, inibição da absorção de glicose no intestino pelo transportador de glicose dependente de sódio 1 (SGLT1), estimulação da secreção de insulina (HANHINEVA *et al.*, 2010) e pela supressão da gliconeogênese hepática (ALKHALIDY *et al.*, 2018). Além disso, os polifenóis podem aumentar a captação de glicose dependente de insulina, aumentar a atividade da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) e a expressão de GLUT4 em células musculares esqueléticas (ALKHALIDY *et al.*, 2015).

Alkhalidy et al. (2018) estudaram os efeitos do kaempferol em camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica e em ratos não obesos alimentados com dieta padrão que durante 6 semanas receberam kaempferol (50 mg/kg/d v.o.) por gavagem. Com 4 e 6 semanas de tratamento, os camundongos obesos alimentados com dieta hiperlipídica suplementada com kaempferol apresentaram níveis de glicose no sangue em jejum mais baixos em comparação com os camundongos obesos controles. No entanto, o kaempferol não teve efeito sobre a glicemia em jejum dos camundongos não obesos alimentados com dieta padrão (ALKHALIDY *et al.*, 2018). Por outro lado, o tratamento com kaempferol melhorou significativamente a tolerância à glicose com diminuição da glicemia aos 60 e 120 min, além de diminuir os valores da área sob a curva nos camundongos obesos, mas não teve efeito na tolerância à glicose, nem na área sob a curva nos camundongos não obesos alimentados com dieta padrão (ALKHALIDY *et al.*, 2018). Segundo os autores, o controle glicêmico nos camundongos obesos tratados com kaempferol foi atribuído à supressão da gliconeogênese hepática e a melhora da sensibilidade à insulina (ALKHALIDY *et al.*, 2018). Pois foi evidenciado *in vivo* e *in vitro* que o kaempferol é capaz de inibir a atividade hepática da piruvato carboxilase e da glicose-6-fosfatase, responsáveis de promover a gliconeogênese no fígado (ALKHALIDY *et al.*, 2018). Após os achados os autores concluíram que o kaempferol não exerceu efeito sobre os fenótipos metabólicos de camundongos não obesos alimentados com dieta padrão, sugerindo que o potencial efeito da suplementação nutricional de kaempferol é mínimo e que os benefícios para a saúde do kaempferol dependem do estado metabólico inicial (ALKHALIDY *et al.*, 2018). Corroborando com esses achados, camundongos idosos alimentados com dieta padrão de laboratório suplementada com 0,01% de kaempferol ou 0,05% de kaempferol por 3 meses não tiveram efeitos na glicemia de jejum, tolerância à glicose e sensibilidade à insulina (ALKHALIDY *et al.*, 2015).

Em parte, nossos resultados podem confirmar esses achados, pois não evidenciamos efeito do uso neonatal de kaempferol sob a glicemia de jejum avaliada em nossos animais aos 62 dias de idade e que foram alimentados com dieta padrão de laboratório. No entanto, quando avaliamos a concentração glicêmica através do teste de tolerância à glicose observamos aumento da curva glicêmica aos 15 minutos após o

início do teste, mas sem alteração na área sob a curva. No estudo de Romero-Juárez et al. (2023), os autores mostraram que camundongos obesos tratados com kaempferol (0.5 mg/kg i.p.) por 32 dias não apresentaram diferenças na concentração glicêmica avaliada através do teste de tolerância à glicose, na área sob a curva, nem na glicemia de jejum. Contudo, após 38 dias de tratamento o kaempferol foi capaz de reduzir significativamente a glicemia de jejum em comparação com o grupo veículo (ROMERO-JUÁREZ *et al.*, 2023). O tratamento com kaempferol (0,05% adicionado à dieta) também tem mostrado melhorar significativamente a hiperglicemia, a tolerância à glicose e os níveis de insulina em camundongos diabéticos obesos (ALKHALIDY *et al.*, 2015). Os estudos expostos acima evidenciam claramente o efeito do kaempferol no controle da glicemia em modelo animal de obesidade (ALKHALIDY *et al.*, 2018; ROMERO-JUÁREZ *et al.*, 2023) e em modelo animal de diabetes (ALKHALIDY *et al.*, 2015), mostrando que de fato o kaempferol teria efeito no controle da glicemia em animais com estado metabólico alterado.

Recentemente, o resveratrol vem ganhando interesse da comunidade científica pelo seu efeito no controle da glicemia em humanos (ABDOLLAHI *et al.*, 2019; HOSEINI *et al.*, 2019) e em roedores (SU, HUNG e CHEN, 2006; DENG *et al.*, 2008). Estudos mostram que a ação do resveratrol na captação de glicose no tecido muscular envolve mecanismos dependentes e independentes de insulina (CHI *et al.*, 2007; DENG *et al.*, 2008; HUANG *et al.*, 2020). Neste último mecanismo o resveratrol estaria envolvido com a sinalização da via ER/PI3K/Akt e, conseqüentemente, com a translocação de GLUT4 para a membrana celular, aumentando a captação de glicose no músculo esquelético (DENG *et al.*, 2008). Dessa forma, o efeito hipoglicêmico do resveratrol estaria associado com o aumento da translocação de GLUT4 para a membrana celular (DENG *et al.*, 2008), mas também pelo aumento da expressão de GLUT4 (CHI *et al.*, 2007) no músculo esquelético. O GLUT4 é uma proteína reguladora chave para o transporte de glicose, contribuindo com a captação de glicose pelas células do músculo esquelético (BRYANT e GOULD, 2020). Deng et al. (2008), em seu estudo, demonstrou que o uso crônico (15 dias ou 15 semanas) de resveratrol (1mg/kg/d v.o. gavagem) aumentou a translocação de GLUT4 para a membrana plasmática e a fosforilação do receptor de insulina (InsR) no músculo sóleo de ratos

resistentes à insulina alimentados com dieta alta em colesterol e frutose. Outro estudo mostrou que o uso durante 14 dias de resveratrol (0,5 mg/kg intragástrico) exerceu efeito anti-hiperglicêmico em ratos diabéticos tipo 1 induzidos por estreptozotocina, sem alteração dos níveis plasmáticos de insulina (SU, HUNG e CHEN, 2006). Isso sugere que o efeito do resveratrol não foi devido à estimulação da secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas e sim provavelmente pelo aumento da sensibilidade à insulina (SU, HUNG e CHEN 2006). Contudo, parece que os efeitos benéficos do resveratrol no controle da glicemia se apresentam não apenas em ratos resistentes à insulina (DENG et al., 2008) ou diabéticos (SU, HUNG e CHEN, 2006), mas também em ratos saudáveis (SU, HUNG e CHEN 2006; CHI et al., 2007). Su, Hung e Chen (2006) mostraram que ratos adultos saudáveis tratados com resveratrol (0,5 mg/kg v.o gavagem) de forma aguda (90 min antes do início do teste de tolerância à glicose) diminuiriam significativamente a glicose no sangue em cada ponto/tempo avaliado durante os 120 minutos do teste, em comparação com o grupo veículo. Outro estudo também mostrou a influência do tratamento agudo com resveratrol (10 mg/kg, v.o. gavagem) na diminuição da glicose plasmática em ratos adultos saudáveis (CHI et al., 2007). No entanto, a diminuição no nível de glicose do grupo tratado com resveratrol em comparação ao grupo controle foi significativo apenas aos 90 e 120 min após o início do teste de tolerância a glicose (CHI *et al.*, 2007).

Diferente efeito foi observado em nossos animais adultos, pois aos 15 minutos de iniciado o teste de tolerância à glicose evidenciamos aumento da glicemia, mas esse efeito não se manteve nos outros pontos/tempos de avaliação. Nossos achados sugerem que o uso crônico neonatal do resveratrol não foi capaz de intervir na diminuição da glicemia na idade adulta. Possivelmente, não observamos efeito na diminuição da glicemia durante o teste de tolerância a glicose porque o efeito hipoglicemiante do resveratrol em ratos saudáveis tem sido observado após administração aguda (SU, HUNG e CHEN, 2006; CHI *et al.*, 2007). Por outro lado, Szkudelski (2006) observou efeito inibitório do resveratrol sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas. Embora o autor do estudo esclareça que o efeito inibitório sobre a secreção de insulina é reversível, isso nos sugere que o resveratrol administrado durante o período crítico do desenvolvimento pode ter interferido no

funcionamento das células  $\beta$ -pancreáticas e possivelmente na formação de insulina na vida adulta. Contudo, não podemos afirmar esse fato, pois em nosso estudo não avaliamos o funcionamento das ilhotas pancreáticas, assim como os níveis de insulina. Por outro lado, Palsamy e Subramanian (2010) através de observações histológicas e ultraestruturais do tecido pancreático de ratos adultos diabéticos induzidos por estreptozotocina e nicotinamida, determinaram que a administração oral de resveratrol (5 mg/kg) pode resgatar as células  $\beta$ -pancreáticas do dano oxidativo sem afetar sua função e integridade estrutural. A ação protetora do resveratrol no tecido pancreático de ratos diabéticos tipo I estaria relacionada com a atividade anti-inflamatória e antioxidante deste composto (PALSAMY e SUBRAMANIAN, 2010). Pois foi observado que o resveratrol é capaz de diminuir significativamente os níveis de marcadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NF- $\kappa$ B unidade p65) e de reverter a diminuição de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona-S-transferase (GST) e catalase) (PALSAMY e SUBRAMANIAN, 2010).

### **7.1.3 Polifenóis e a atividade locomotora**

Em relação a nosso objetivo de estudar o efeito do uso neonatal de kaempferol e resveratrol sobre o desenvolvimento da locomoção, nós avaliamos parâmetros da atividade locomotora no campo aberto, os quais nos permitem avaliar as propriedades biomecânicas e comportamentais da atividade locomotora em roedores (ARAGÃO RDA *et al.*, 2011). Evidências sugerem que os polifenóis podem exercer efeitos neuroprotetivos, protegendo os neurônios contra lesões induzidas pelo estresse, suprimindo a neuroinflamação e conseqüentemente promovendo o desempenho neuromotor (DI MEO *et al.*, 2020). Mas pouco se sabe sobre o efeito dos polifenóis, especificamente do kaempferol e do resveratrol no desenvolvimento da locomoção. No rato, o desenvolvimento da locomoção ocorre de maneira coordenada, sendo necessária a integridade, maturação e integração entre o sistema nervoso central (SNC) e o musculoesquelético (FOX, 1965; GRAMSBERGEN, 1998; JAMON, 2006). Ratos são frequentemente escolhidos para este tipo de análise, pois nascem em um estágio inicial de neuro-ontogenia, permitindo a observação do desenvolvimento dos

padrões da locomoção no período pós-natal (GRAMSBERGEN, 1998). Dessa forma avaliamos a atividade locomotora em idades que estão relacionadas a eventos importantes na aquisição da locomoção durante o período de lactação, assim como o desenvolvimento do padrão adulto da locomoção durante a adolescência.

Na avaliação intragrupos, nós observamos que todos os grupos experimentais mostraram aumento progressivo da distância percorrida a partir da segunda semana de vida, permanecendo esse aumento até o 30º DPN no grupo veículo e kaempferol. Sabe-se que entre a segunda e a terceira semana pós-natal a locomoção no rato desenvolve-se rapidamente (MUIR 2000; WESTERGA e GRAMSBERGEN, 1990). Nos parâmetros relacionados como a capacidade dos animais de transformar força muscular em movimento, observamos que a velocidade média teve similar desenvolvimento que a distância percorrida para todos os grupos. No entanto, a potência média e a energia cinética apresentaram aumento a partir do desmame até a adolescência em todos os grupos. Esse aumento da potência e do gasto de energia estaria relacionado com uma capacidade maior de deslocar o corpo ao redor do campo (CADENA-BURBANO *et al.*, 2019). Em relação aos parâmetros comportamentais da locomoção, observamos que na segunda e terceira semana pós-natal os animais kaempferol e resveratrol passam menos tempo imóveis, menos tempo na área central e progressivamente aumentam seu tempo na área periférica. O aumento do tempo na área periférica está relacionado ao aumento da atividade exploratória e ao desenvolvimento de tigmotaxia (BÂ e SERI 1995; JAMON 2006). Enquanto que, o grupo veículo apresentou diminuição da imobilidade e aumento no número de paradas só a partir da terceira semana pós-natal. Ambos os polifenóis mostram-se favoráveis no estímulo do desenvolvimento da locomoção nas idades consideradas marcos do desenvolvimento.

Na avaliação intergrupar, observamos que os animais do grupo resveratrol se destacaram na maioria dos parâmetros avaliados em relação aos animais do grupo veículo e/ou kaempferol. Animais do grupo resveratrol apresentaram maior distância percorrida em relação aos animais do grupo veículo no 17º DPN e 21º DPN. A potência média foi maior nos animais do grupo resveratrol em relação aos animais veículo e kaempferol no 21º DPN e 60º DPN. Animais no 60º DPN do grupo resveratrol apresentaram maior energia cinética em comparação aos animais do grupo kaempferol.

Apenas no 17º DPN animais do grupo resveratrol apresentaram menor tempo de imobilidade em relação aos animais do grupo veículo. O número de paradas foi menor no grupo resveratrol quando comparado com os grupos veículo e kaempferol no 8º DPN e 14º DPN. Quanto ao tempo de permanência em cada área do campo aberto, o grupo resveratrol apresentou maior tempo de permanência na área central e menor tempo de permanência na área intermediária em relação ao grupo kaempferol no 8º DPN.

Estudos com ambos os polifenóis (kaempferol e resveratrol) mostram resultados controversos na atividade locomotora e exploratória, que podem estar relacionados com a dose, tempo de uso, via de administração e modelo experimental a ser estudado (SLOLEY *et al.*, 2000; BUSANELLO *et al.*, 2011; BUSANELLO *et al.*, 2012; GE *et al.*, 2016; KARAM e RADWAN, 2020). Busanello *et al.* (2012) avaliou no campo aberto a atividade locomotora e exploratória, representadas pelo número de cruzamentos e pelo número de *rearing*, respectivamente, em ratos machos adultos tratados com flufenazina e/ou resveratrol (1 mg/kg, s.c., 3 vezes por semana, durante 21 dias). Observou que o co-tratamento com resveratrol não foi capaz de prevenir a redução da atividade locomotora e do comportamento exploratório, causados pela flufenazina (BUSANELLO *et al.* 2012). Além disso, ambos os parâmetros não foram modificados no grupo tratado apenas com resveratrol (BUSANELLO *et al.* 2012). Da mesma forma, a administração do resveratrol (5 mg/kg, i.p., por 3 dias consecutivos) não foi capaz de atenuar a hipolocomoção causada pela reserpina em camundongos (BUSANELLO *et al.*, 2011). Ambos os estudos mostram que o resveratrol não foi capaz de prevenir a redução da atividade locomotora, causada pelo bloqueio medicamentoso dos receptores de dopamina (BUSANELLO *et al.*, 2011; BUSANELLO *et al.*, 2012). No entanto, foi observado que o resveratrol é capaz de aumentar a captação de NA/5-HT e de reduzir a atividade da monoamina oxidase (MAO) (YÁÑEZ *et al.*, 2006), o que, conseqüentemente, poderia aumentar a atividade locomotora e exploratória causada pela disponibilidade de neurotransmissores como a dopamina, noradrenalina e serotonina.

Karam e Radwan (2020) observaram, mediante o teste de campo aberto, o restabelecimento da locomoção e do comportamento exploratório em camundongos fêmeas adultas tratadas com diazepam e resveratrol (20 mg/kg/dia, v.o., por 3

semanas) em relação ao grupo diazepam. Esse resultado indica que o resveratrol foi capaz de abolir os efeitos do diazepam na locomoção e no comportamento exploratório, expressos pelo menor número de quadrados cruzados e pelo menor número de *rearing* e *grooming*, respectivamente (KARAM e RADWAN, 2020). O aprimoramento de ambos os parâmetros foi corroborado pelo aumento significativo do conteúdo de aminas biogênicas no tecido cerebral dos camundongos (serotonina, noradrenalina e dopamina) (KARAM e RADWAN 2020). No estudo de Ge et al. (2016), o uso de resveratrol (15 mg/kg/d, intragátrico, por 16 dias) em ratos machos com hipotireoidismo subclínico, foi capaz de aumentar a atividade locomotora e o comportamento exploratório representados pela distância total, velocidade média e pelo número de *rearing*, respectivamente. A regulação negativa da hiperatividade do eixo HPA e a regulação tanto do eixo HPT quanto da via Wnt/ $\beta$ -catenina, estariam por trás desses desfechos (GE et al., 2016). Interessantemente, nossos animais tratados com resveratrol durante o período neonatal, mas sem nenhuma intervenção medicamentosa ou dietética, mostraram maior deslocamento horizontal no campo aberto, representado pelo aumento da distância percorrida e potência média durante a lactação. Desta forma, o resveratrol foi capaz de aumentar a atividade locomotora desses animais enquanto havia o tratamento. Após o desmame, somente foi observado aumento da energia cinética e da potência média (no 60° DPN). Essas mudanças podem estar mais ligadas a melhora do desempenho locomotor do que a mudanças na exploração.

Contudo, nós não observamos diferenças na locomoção nos animais tratados com kaempferol. Sloley et al. (2000) mostrou que a administração oral (10 mg/kg, 1h e 3 h) e intraperitoneal (50 mg/kg, 3 h) de kaempferol não inibiu a atividade da MAO-A ou MAO-B no cérebro de ratos. Sabe-se que a inibição da MAO-A e da MAO-B aumenta a disponibilidade de neurotransmissores de monoamina ou seus metabólitos no cérebro (SLOLEY et al. 2000). Foi demonstrado que o extrato de folhas de *Ginkgo biloba* (200 mg/kg, i.p., 3h), fonte de kaempferol e de outros flavonoides, não alterou as concentrações de noradrenalina, dopamina, 5-HT e 5-HIAA no córtex, corpo estriado e hipotálamo de camundongos (SLOLEY et al. 2000). Esses achados nos sugerem que o kaempferol e o resveratrol possuem diferentes mecanismo de ação, que podem estar relacionados com sua estrutura química (SLOLEY et al. 2000) e polaridade (YANG et

al., 2000). Pois a presença de mais de um grupo hidroxila no anel 2-fenil, como na quercetina e na miricetina, pertencentes à mesma família do kaempferol, resulta na diminuição da atividade inibidora da MAO-A e MAO-B (SLOLEY et al. 2000). Por tanto, esses flavonoides, incluindo o kaempferol teriam pouco efeito no estímulo do SNC (SLOLEY et al. 2000; YANG et al., 2015). No estudo de Yang et al. (2015) não observaram efeito na atividade locomotora de camundongos machos tratados com kaempferol, quercetina, kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glicose e quercetina-3-O- $\beta$ -D-glicose (0,35 mM/kg, i.p., 60 min antes do teste de campo aberto) isolados das folhas do *Apocynum venetum* Linn (*Apocynaceae*). Os autores concluíram que os quatro flavonoides não tiveram efeitos estimulantes do SNC, conseqüentemente tampouco da atividade locomotora (YANG et al. 2015). No entanto, o kaempferol isolado das folhas do *Apocynum venetum* Linn (*Apocynaceae*) tem se mostrado capaz de diminuir o comportamento semelhante à ansiedade (GRUNDMANN et al., 2007; GRUNDMANN et al., 2009) e à depressão (YANG et al., 2015) em camundongos. Grundmann et al. (2009) verificaram efeito ansiolítico em todas as doses testadas de kaempferol isolado (0,02; 0,08; 0,05 e 1,0 mg/kg) administrado por via oral, 60 minutos antes da avaliação no labirinto em cruz elevado (LCE). O efeito ansiolítico foi evidenciado pelo maior tempo de permanência dos camundongos nos braços abertos do LCE. Porém, o kaempferol (0,02; 0,05 e 1,0 mg/kg) após administração intraperitoneal não mostrou efeito ansiolítico, em nenhuma das doses testadas (GRUNDMANN et al., 2009). Um dos principais metabólitos intestinais do kaempferol é o ácido 4-hidroxifenilacético (4-HPAA) e seus efeitos ansiolíticos são atribuídos ao dito metabólito (ZABELA et al., 2016). No estudo de Vissienon et al. (2012) foi observado efeito ansiolítico do kaempferol e do seu metabólito o ácido *para*-hidroxifenilacético (*p*-HPAA) após administração oral e intraperitoneal, respectivamente. Não sendo evidenciado efeito ansiolítico do kaempferol após administração por via intraperitoneal, corroborando a hipótese de que o kaempferol atua como ansiolítico quando é transformado em seu metabólito ativo o ácido hidroxifenilacético pela microflora intestinal (VISSIENNON et al. 2012). Os achados desses estudos (GRUNDMANN et al., 2009; VISSIENNON et al. 2012; ZABELA et al., 2016) podem-nos ajudar a compreender o porquê de não termos

encontrado efeito ansiolítico, avaliado através do tempo de permanência nas áreas do campo aberto, em nossos animais tratados com kaempferol por via intraperitoneal.

Porém vários estudos com resveratrol demonstram que este estilbeno pode melhorar o comportamento semelhante à ansiedade e à depressão (GE *et al.*, 2015; GE *et al.*, 2016; KARAM e RADWAN, 2020). Ge *et al.* (2015) investigou os efeitos do resveratrol (80 mg/kg, i.p., por 7 dias consecutivos) no comportamento semelhante à depressão induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em camundongos adultos. Os resultados mostraram que o resveratrol reverteu o aumento do tempo de imobilidade induzido por LPS, avaliado no teste de nado forçado e no teste de suspensão da cauda. Segundo os autores, a ação antidepressiva do resveratrol estaria relacionada a sua capacidade de reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), consequentemente aumentando a expressão da proteína de ligação ao elemento de resposta do AMPc fosforilado (pCREB) e do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) no córtex pré-frontal e hipocampo (GE *et al.*, 2015). Além do exposto, dentre os mecanismos responsáveis pelo efeito ansiolítico e antidepressivo do resveratrol estariam o aumentando dos níveis de Sirt1 pela supressão da produção de citocinas inflamatórias (NF- $\kappa$ B e NLRP3) no hipocampo (LIU *et al.*, 2019), a diminuição da hiperatividade do eixo HPA (GE *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2018) e o aumento da disponibilidade das aminas biogênicas (serotonina, noradrenalina e dopamina) nos tecidos cerebrais (KARAM e RADWAN 2020). Corroborando esses estudos, nossos resultados sugerem que durante o período de lactação o resveratrol teve efeito na diminuição do comportamento semelhante à ansiedade, evidenciado pelo menor tempo de permanência na área central do campo aberto e pelo menor tempo de imobilidade e menor número de paradas, respectivamente.

Além dos efeitos do resveratrol no quesito comportamental, nosso trabalho também mostra que o resveratrol foi capaz de melhorar a locomoção no quesito biomecânico e metabólico na adolescência. A resistência física induzida pelo resveratrol tem sido amplamente atribuída a aumento da função mitocondrial (LAGOUGE *et al.*, 2006; UM *et al.*, 2010). Camundongos alimentados com dieta rica em gordura suplementada com resveratrol (400 mg/kg/d) durante 12 semanas, mostraram aumento da resistência física, conforme evidenciado pelo aumento do tempo de corrida (UM *et*

*al.*, 2010). O efeito do resveratrol, na resistência física, foi atribuído ao aumento da expressão de genes envolvidos com a biogênese mitocondrial (PGC-1a, PGC-1b) e a fosforilação oxidativa (MCAD) no músculo esquelético (UM *et al.*, 2010). Sugerindo que o resveratrol poderia induzir a conversão do tipo de fibra muscular, por meio da ativação do PGC-1a, pois as fibras oxidativas do tipo I estão associadas ao aumento da resistência física. Sabe-se que o PGC-1a se expressa em vários tecidos, incluindo o músculo esquelético, e é considerado o principal regulador da biogênese mitocondrial e do metabolismo energético celular (LIN *et al.*, 2002). Por sua vez, o PGC-1a é expresso preferencialmente em fibras do tipo I oxidativas (contração lenta), que são muito ricas em conteúdo mitocondrial (BERCHTOLD *et al.* 2000; LIN *et al.*, 2002). Interessantemente, Lagouge *et al.* (2006) observaram maior distância média percorrida até a exaustão, em camundongos alimentados tanto com dieta padrão de laboratório como com dieta rica em gordura suplementadas com resveratrol (4 g/kg de alimento, para fornecer uma dose de 400 mg/kg/d), em relação a seus controles não suplementados com resveratrol. O aumento significativo da resistência física dos animais tratados com resveratrol foi consistente com o aumento da atividade mitocondrial e com a conversão das fibras musculares glicolíticas em direção a um fenótipo de tipo oxidativo (LAGOUGE *et al.*, 2006). Esses importantes achados nos sugerem que através desses mecanismos o resveratrol pode ter melhorado o desempenho locomotor de nossos animais adolescentes, conforme evidenciado pelo aumento da potência média e da energia cinética.

O resveratrol também tem se mostrado eficiente no aumento da coordenação motora, força muscular e de tração, conforme revelado no rotarod, testes de força de preensão e de corda, respectivamente (LAGOUGE *et al.*, 2006). Baur *et al.*, 2006 avaliaram o equilíbrio e a coordenação motora através do rotarod em camundongos idosos alimentados com dieta hipercalórica (HC) suplementada com resveratrol (R) (22.4 mg/kg/d). Os autores observaram que os animais HCR melhoraram constantemente suas habilidades motoras à medida que envelheciam, a ponto de serem indistinguíveis do grupo alimentado com dieta padrão de laboratório. Surpreendentemente, o desempenho no rotarod também foi melhorado nos camundongos alimentados com dieta padrão de laboratório suplementada com

resveratrol (BAUR *et al.*, 2006), sugerindo que o resveratrol pode melhorar a função neuromuscular em animais expostos a dieta hiperlipídica ou a dieta padrão (BAUR *et al.*, 2006; LAGOUGE *et al.*, 2006). No entanto, em nosso trabalho não observamos efeito do kaempferol na melhora do desempenho locomotor em relação aos grupos veículo ou resveratrol. Li e Pu (2011) observaram melhora da coordenação motora, aumento da atividade locomotora espontânea e aumento nos níveis de superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-PX) em modelo de doença de Parkinson em camundongos adultos tratados com kaempferol (50 e 100 mg/kg, v.o.) durante 14 dias. O efeito do kaempferol foi dependente da dose usada. Os autores concluíram que os efeitos neuroprotetores evidenciados pelo uso do kaempferol estão relacionados com sua elevada capacidade antioxidante.

## 7.2 ARTIGO ORIGINAL 2 - “REPERCUSSÕES DA ADMINISTRAÇÃO NEONATAL DE KAEMPFEROL E RESVERATROL NA FLEXIBILIDADE COMPORTAMENTAL E METABÓLICA MUSCULAR DE RATOS MACHOS”

Na segunda parte da tese, os dados foram agrupados pela manipulação neonatal com os polifenóis kaempferol e resveratrol e pelo status nutricional (alimentado e jejum de 24 horas) após o desmame.

### 7.2.1 Polifenóis e resposta comportamental ao jejum

Na avaliação da atividade locomotora no campo aberto por 15 minutos, os animais Veículo<sub>24H</sub> mostraram maior distância percorrida e menor potência média e número de paradas, aos 30 dias. Em relação ao comportamento alimentar, ambos polifenóis foram capazes de antecipar o ponto de saciedade aos 30 dias de idade. Contudo, na avaliação da microestrutura da SCS, apenas o grupo resveratrol apresentou menor duração e frequência de alimentação. Aos 60 dias, o grupo resveratrol não conseguiu atingir o ponto de saciedade, porém, sem mudanças na microestrutura da SCS.

A locomoção tem várias funções para os animais, uma delas é a busca pelo alimento, o forrageamento (JORDAN, 1998; HUANG, SHYU e HSIAO, 2010). Desta forma, estudamos o comportamento locomotor dos animais submetidos a jejum de 24h comparando-os com animais em estado alimentado. Observamos apenas que os animais que receberam veículo durante a lactação e estavam em jejum de 24h apresentaram maior deslocamento no campo com redução no número de paradas. Esse resultado pode demonstrar maior exploração do ambiente pelo animal (KELLEY 1993), já que, animais submetidos a privação de alimento podem ser mais ativos e podem explorar mais do que os animais saciados (KELLEY 1993; WILLIAM et al., 2002; ZHU et al., 2014). No estudo de Zhu e colaboradores (2014), ratos machos adultos submetidos a privação alimentar mostraram maior atividade geral (movimentos ativos, como caminhar ao redor da gaiola) em relação ao grupo controle (alimentado *ad libitum*). Resultados semelhante foram encontrados em camundongos (WILLIAM et al.,

2002), o que indica que roedores aumentam a atividade locomotora para procurar alimento quando este é limitado ou imprevisível (ZHU *et al.*, 2014).

Para análise do comportamento alimentar, avaliamos o consumo alimentar, o ponto de saciedade e a microestrutura da SCS, aos 30 e 60 dias de idade, apenas nos animais que formaram parte do subgrupo (jejum de 24 horas) e que durante o período neonatal foram tratados com o veículo, kaempferol e resveratrol. A administração neonatal de kaempferol e resveratrol não alterou o consumo alimentar relativo diário médio dos animais em ambos os períodos de avaliação. Resultados semelhantes foram observados em camundongos adultos alimentados com dieta padrão e tratados com kaempferol (ALKHALIDY *et al.*, 2018) ou resveratrol (ANDRADE *et al.*, 2014). Da mesma forma, ratos e camundongos expostos a dieta HF (*High Fat*) e tratados com kaempferol (CHANG *et al.*, 2011; CHAVES *et al.*, 2020; ROMERO-JUÁREZ *et al.*, 2023) ou resveratrol (LAGOUGE *et al.*, 2006; MACARULLA *et al.*, 2009; ALBERDI *et al.*, 2011) não mostraram diferença no consumo alimentar. No entanto, a supressão do consumo alimentar foi observada em camundongos C57BL/6 obesos alimentados com dieta HF e tratados com o extrato etanólico da própolis verde brasileira (WASHIO, SHIMAMOTO e KITAMURA, 2015), fonte de vários flavonoides, incluindo o kaempferol (KITAMURA *et al.*, 2018). O aumento da expressão de mRNA de leptina no tecido adiposo epididimal e em adipócitos 3T3-L1 diferenciados, induzido pela própolis verde brasileira, estaria por trás da supressão da alimentação (WASHIO, SHIMAMOTO e KITAMURA, 2015). A leptina é uma adipocina liberada essencialmente por adipócitos brancos maduros que regula a atividade neural do centro de alimentação no hipotálamo, reduzindo a ingestão de alimentos e aumentando o gasto energético (SAHU, 2004). Em roedores, a lactação é um período crítico para a formação e maturação de áreas hipotalâmicas, como o núcleo arqueado (ARC), que é o principal local de ação da leptina (FRANCO *et al.*, 2016). No SNC, acredita-se que os receptores de leptina (LepRs) no hipotálamo medeiam a saciedade diminuindo os níveis do neuropeptídeo Y (NPY) e/ou aumentando o metabolismo através da ativação do sistema simpático eferente (CAMPFIELD, SMITH e BURN, 1996; AHIMA e ANTWI, 2008).

A análise da SCS é um método não invasivo e facilmente reproduzível, através dele podem ser identificadas alterações no comportamento alimentar, principalmente na

saciedade, induzidas por manipulações farmacológicas (HALFORD, WANNINAYAKE e BLUNDELL, 1998). No presente estudo, o ponto de saciedade foi antecipado pelo tratamento neonatal com kaempferol e resveratrol, no entanto, apenas o resveratrol foi capaz de influenciar na microestrutura da SCS aos 30 dias de idade. Embora sejam poucos os estudos que têm examinado os efeitos dos polifenóis na regulação de neuropeptídeos e neuro-hormônios no SNC, alguns polifenóis parecem claramente ter o potencial de modular os neuropeptídeos envolvidos na ingestão de alimentos e na saciedade. Por exemplo, o extrato aquoso da semente adlay (*coix lachryma-jobi var. mayuen*), rico em compostos fenólicos, reduziu o consumo alimentar com concomitante diminuição nos níveis de NPY e LepR mRNA no hipotálamo de ratos machos Sprague-Dawley alimentados com dieta HF (KIM, YUN e LEE, 2007). Além do NPY, a proteína relacionada ao agouti (AgRP) têm importantes efeitos estimuladores na ingestão de alimentos, o que sugere que a regulação negativa do NPY ou da AgRP no hipotálamo pode inibir a ingestão de alimentos (PANICKAR, 2013). No estudo de Kim e colaboradores (2010), o resveratrol (100 mg/kg de peso corporal) administrado por via intraperitoneal em camundongos C57BL/6J alimentados com dieta padrão, suprimiu significativamente a ingestão de alimentos até 48 horas após a injeção única deste polifenol (KIM *et al.*, 2010). O estudo demonstrou ainda, que o resveratrol regulou negativamente as atividades de luciferase dirigidas pelo promotor de NPY e AgRP de maneira dose-dependente em células neuronais N29-4 (KIM *et al.*, 2010), mostrando o potencial efeito inibitório do resveratrol na expressão gênica de ambos os neuropeptídeos orexígenos (KIM *et al.*, 2010). Possivelmente, o resveratrol tenha modulado a expressão de neuropeptídeos orexígenos durante o período crítico do desenvolvimento. Pois através da avaliação da microestrutura da SCS nós observamos, aos 30 dias de idade, diminuição no tempo de duração da alimentação e da frequência de alimentação nos animais que receberam resveratrol no período neonatal em relação ao grupo veículo. A administração crônica de resveratrol durante a vida adulta também tem mostrado ser capaz de normalizar a ingestão alimentar em ratos machos *Wistar* (FRANCO *et al.*, 2013; FRANCO *et al.*, 2014). Esse efeito foi associado à diminuição da expressão do NPY e à melhora da sensibilidade à leptina evidenciada pela ativação da via JAK2/STAT3 no hipotálamo (FRANCO *et al.*, 2014). Por outro lado, a

suplementação com resveratrol por quatro semanas em lêmures de camundongos não mostrou nenhuma mudança significativa ao avaliar vários hormônios intestinais (GLP-1, PYY e PP) envolvidos no processo de saciedade (DAL-PAN, BLANC e AUJARD, 2010). Por outro lado, o kaempferol não influenciou em nenhum dos parâmetros avaliados na microestrutura da SCS. Diferente de nossos achados, no estudo de Chaves et al. (2020), o kaempferol mostrou redução no tempo de latência alimentar na análise da microestrutura da SCS na prole de mães HFD. Segundo os autores do estudo, o kaempferol teria ajudado a reduzir o comportamento do tipo ansiedade na prole de mães HFD, em lugar de ter influenciado no próprio comportamento alimentar (CHAVES *et al.*, 2020).

Em ratos e outros mamíferos, a ingestão de alimentos induz gradualmente a saciedade, um processo pelo qual o comportamento alimentar dá lugar a atividades não alimentares como a limpeza e eventualmente ao descanso (ISHII *et al.*, 2003). Quando avaliamos o comportamento alimentar aos 60 dias de idade, não observamos influência tanto do kaempferol e do resveratrol na ingestão alimentar, nem na microestrutura da SCS. Apenas os grupos Veículo e Kaempferol alcançaram o ponto de saciedade que é estabelecido pelo cruzamento entre os comportamentos de alimentação e descanso. No entanto, o ponto de saciedade não foi alcançado pelo grupo tratado com resveratrol. Nós verificamos se essa influência estaria relacionada ao número de animais que descansaram, contudo não observamos diferenças entre os grupos. No estudo de Ishii (2003) foi observado no teste de SCS, que a privação alimentar (6 e 12 horas) intensificou e prolongou o comportamento de alimentação, levando a uma transição tardia entre a alimentação e o descanso. Isso nos sugere que o tempo de jejum (24 horas) usado em nosso estudo pode ter influenciado nos comportamentos de alimentação e descanso, com maior intensidade nos animais tratados com resveratrol, visto que o tempo de jejum prévio ao teste de SCS comumente utilizado é de 3 a 4 horas (CHAVES *et al.*, 2020; DE SOUZA *et al.*, 2020). A diferença dos efeitos provocados pelo resveratrol no comportamento alimentar aos 30 e 60 dias de idade pode estar relacionada com os níveis de fatores neurotróficos, especificamente do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Vários trabalhos têm mostrado que o resveratrol é capaz de aumentar os níveis do BDNF em diferentes estruturas cerebrais

(WANG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2014; GE *et al.*, 2015). O BDNF é uma neurotrofina encontrada em altas concentrações no hipocampo e córtex cerebral, sendo considerada molécula-chave na manutenção da plasticidade sináptica e na sobrevivência das células neuronais (BATHINA e DAS, 2015; MIRANDA *et al.*, 2019). Além da plasticidade neuronal, o BDNF e seu receptor de tirosina quinase, TrkB, são expressos em núcleos hipotalâmicos associados à saciedade e à atividade locomotora (KERNIE, LIEBL e PARADA, 2000). A deficiência desta neurotrofina implicaria em menor resposta de saciedade e aumento da atividade locomotora. Além disso, sabe-se que o BDNF e seu receptor TrkB diminuem com a idade (CROLL *et al.*, 1998; LOMMATZSCH *et al.*, 2005). Sugerindo-nos que os níveis do BDNF e de seu receptor TrkB, envolvidos no processo de saciedade, podem ter diminuído nos nossos animais adolescentes em relação aos animais pré-adolescentes.

### **7.2.2 Polifenóis e resposta metabólica ao jejum**

Nos grupos kaempferol e resveratrol, o jejum aumentou o peso relativo do tecido adiposo epididimal em relação ao status alimentado. O jejum foi capaz de diminuir os níveis séricos de glicose, triglicerídeos e o peso relativo do fígado em todos os grupos de tratamento farmacológico em relação ao status alimentado. No grupo veículo, o jejum foi capaz de diminuir o nível sérico do colesterol total e aumentar o peso relativo do encéfalo em relação ao status alimentado. Apenas no grupo resveratrol, o jejum aumentou o nível sérico do colesterol HDL em relação ao status alimentado. Em condição de jejum, ambos polifenóis aumentaram os níveis séricos do colesterol total em relação ao grupo veículo.

No estudo de Alberdi *et al.* (2011), ratos machos tratados com resveratrol (30 mg/kg/d) adicionado à dieta obesogênica, apresentaram redução do tecido adiposo branco (epididimal, perirrenal, mesentérico e subcutâneo). Da mesma forma, ratos machos tratados por 6 semanas com diferentes doses de resveratrol (6, 30 e 60 mg/kg de peso corporal/d) adicionado à superfície de dieta hipercalórica, na dose intermediária de resveratrol (30 mg/kg/d) reduziram todos os depósitos adiposos avaliados (epididimal, perirrenal, mesentérico e subcutâneo) e a dose mais alta (60 mg/kg/d)

apenas reduziu o tecido adiposo mesentéricos e subcutâneos (MACARULLA *et al.*, 2009). No estudo de Lagouge *et al.* (2006), camundongos C57BL/6J tratados durante 15 semanas com resveratrol (400 mg/kg de peso corporal/d) adicionado à dieta rica em gordura, apresentaram menor peso corporal final acompanhado por menor percentagem de gordura corporal total e dos depósitos adiposos avaliados (epidídimal, retroperitoneal e inguinal). O aumento da degradação do tecido adiposo provocado pela administração de resveratrol estaria associado à ativação da AMPK e à inibição da ACC nesse tecido, o que conduz a um aumento da oxidação e inibição da síntese de ácidos graxos (RIVERA *et al.*, 2009). Além disso, a redução da lipogênese, provocada pelo resveratrol contribuiria para a redução da gordura corporal (ALBERDI *et al.*, 2011). Esses estudos nos sugerem que o resveratrol pode ser um aliado na redução da adiposidade corporal, tanto em animais alimentados com dieta padrão como com dieta obesogênica/hipercalórica (LAGOUGE *et al.*, 2006; MACARULLA *et al.*, 2009; RIVERA *et al.*, 2009; ALBERDI *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2014). No estudo de Rivera *et al.* (2009), ratos obesos Zucker tratados com resveratrol (10 mg/kg/d, gavagem) apresentaram redução do tecido adiposo abdominal (epidídimal e retroperitoneal) acompanhado pela redução de ácidos graxos livres (AGL), colesterol e triglicerídeos plasmáticos, após 8 semanas de tratamento. Segundo os autores, a diminuição dos níveis circulantes de AGL, leva à diminuição da produção e acúmulo de triglicerídeos e colesterol, efeito que por sua vez está relacionado à redução do tecido adiposo (RIVERA *et al.*, 2009).

Diferente dos estudos apresentados, no presente trabalho, não observamos diminuição do tecido adiposo abdominal (somatório dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico). No entanto, quando avaliados individualmente, o tecido adiposo epididimal apresentou-se maior nos animais tratados com resveratrol e kaempferol durante o período neonatal e submetidos a jejum de 24 horas antes da coleta do tecido adiposo, em relação ao mesmo grupo de tratamento, mas em estado alimentado. O tecido adiposo é um importante regulador da homeostase energética de todo o corpo (LUO *et al.*, 2015; IBRAHIM *et al.*, 2020) e uma das principais funções desse tecido é atuar como um reservatório para armazenamento de combustível na forma de triglicerídeos, bem como mobilizar esse combustível quando necessário, por

exemplo, durante o jejum ou em situações de elevada demanda energética (PALOU *et al.*, 2010). Além disso, sabe-se que dependendo da localização anatômica no corpo, o tecido adiposo apresenta diferenças na atividade metabólica (BJØRNDAL *et al.*, 2011). Por exemplo, em ratos eutróficos, a taxa de síntese lipídica (lipogênese) mostrou ser maior no tecido adiposo perirrenal e gonadal do que no tecido adiposo subcutâneo (JAMDAR, 1978). Embora estudos mostrem que o jejum é capaz de diminuir os depósitos de gordura internos (retroperitoneal, mesentérico, epididimal) e subcutâneos (inguinal), estes podem ser menos mobilizados a depender de suas características metabólicas e do tempo de exposição ao jejum (PALOU *et al.*, 2010; IBRAHIM *et al.*, 2020). No estudo de Ibrahim *et al.* (2020), após jejum prolongado, foi observado no tecido adiposo epididimal de ratos machos diminuição nos níveis de fatores envolvidos no metabolismo lipídico, dentre eles, a adiponectina. Apesar de os mecanismos de ação não serem bem estabelecidos, foi relatado que a adiponectina pode aumentar a expansão do tecido adiposo saudável (TAO, SIFUENTES e HOLLAND, 2014) e que sua expressão diminui à medida que o tecido adiposo aumenta (OUCHI *et al.*, 1999). Estas informações nos sugerem que o aumento do tecido adiposo epididimal encontrado em nossos animais, pode ser um mecanismo de preservação de energia, como resposta ao jejum de 24 horas, e que também estaria relacionado à característica metabólica própria do tecido adiposo epididimal.

Em relação ao perfil lipídico estudos em humanos mostram que o jejum é capaz de aumentar os níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL) e de diminuir os níveis de lipoproteínas diretamente relacionadas ao LDL (ADLOUNI *et al.*, 1997; FAKHRZADEH *et al.*, 2003; SHEHAB *et al.*, 2012). A melhora do perfil lipídico em relação ao jejum é causada pelo aumento da expressão nuclear de PPAR $\alpha$  e PGC-1 $\alpha$  no fígado (WANG 2010), o que leva ao aumento da oxidação de ácidos graxos e produção de apolipoproteína A (apo A), enquanto a apolipoproteína B (apo B) diminui (ADLOUNI *et al.*, 1998). Dessa forma, a produção elevada de apo A leva ao aumento dos níveis HDL, pois está bem estabelecido que a apo A é o principal componente proteico do HDL (ADLOUNI *et al.*, 1998). Por outro lado, o aumento da oxidação de ácidos graxos leva à diminuição dos triglicerídeos hepáticos, diminuindo assim a produção de VLDL e os níveis séricos de triglicerídeos, VLDL, LDL e LDL pequeno e

denso (sdLDL). Além disso, a redução da produção de apo B contribui para a diminuição dos níveis séricos de VLDL, LDL e sdLDL. Os níveis séricos de colesterol total também são modificados pelo jejum. Pois foi visto que o jejum diminui a expressão da proteína de ligação do elemento regulador de esteróis 2 (SREPB-2) (HORTON et al., 1998; SATO 2010), diminuindo a ação de várias enzimas responsáveis pela síntese de colesterol (SHIBATA *et al.*, 2006). Essas informações validam nossos resultados, visto que nós observamos aumento dos níveis séricos de HDL e diminuição dos níveis séricos de triglicerídeos e colesterol total após jejum de 24 horas em relação ao estado alimentado, em alguns ou em todos os grupos de tratamento farmacológico (veículo, kaempferol, resveratrol). Contudo, os níveis de colesterol total apresentaram-se elevados apenas nos grupos Resveratrol<sub>24H</sub> e Kaempferol<sub>24H</sub> em relação ao grupo Veículo<sub>24H</sub>. O jejum pode ser um tipo de estresse que leva a um aumento transitório do colesterol total, um evento previamente descrito no contexto de um jejum de água de 24 horas (GALETTI *et al.*, 2021).

Sabe-se que a glicose serve como fonte primária de energia para a maioria dos tecidos e que é armazenada na forma de glicogênio no fígado e no músculo esquelético (RUI, 2014; DUREGON *et al.*, 2021). Durante o estágio inicial do jejum, os níveis de insulina caem, causando a liberação de glicose pelo fígado por meio da quebra do glicogênio armazenado (glicogenólise), com o intuito de manter os níveis de glicose no sangue (DUREGON et al., 2021). Posteriormente, durante o jejum prolongado (12 a 24 horas) há redução de 20% ou mais na glicose sérica e depleção do glicogênio hepático (LONGO e MATTSON, 2014). Após a depleção hepática de glicogênio, corpos cetônicos, glicerol derivado de gordura e aminoácidos são responsáveis pela geração de glicose (gliconeogênese), que é utilizada principalmente pelo cérebro (LONGO e MATTSON, 2014). Em nosso estudo, o jejum de 24 horas versus o estado alimentado, diminuiu os níveis de glicose sérica, assim como o peso relativo do fígado, em todos os grupos de tratamento farmacológico. No entanto, o peso relativo do encéfalo foi maior nos animais veículo submetidos a jejum de 24 horas versus o estado alimentado. Embora a privação severa de alimentos resulte em diminuição no tamanho da maioria dos órgãos, isso não acontece com o cérebro, pois a manutenção das funções cognitivas em condições de escassez de alimentos é de importância preeminente

(WEINDRUCH e SOHAL, 1997). Como evidenciado em nosso estudo, órgãos como o fígado podem diminuir de tamanho após o jejum. No estudo de Guan et al. (2009) camundongos machos C57BL/6J e SJL/J apresentaram menor peso do fígado após jejum de 24 horas em relação aos animais em estado alimentado. A diminuição dos estoques de glicogênio hepático, como resposta metabólica ao jejum, pode estar relacionada com a diminuição de peso do fígado (LÓPEZ-SOLDADO *et al.*, 2020). No entanto, o mesmo efeito não aconteceria com o músculo esquelético. Pois foi observado que após 36 horas de privação alimentar a concentração de glicogênio, lactato e ATP no músculo gastrocnêmio de camundongos machos controle, não foi alterada (LÓPEZ-SOLDADO *et al.*, 2020). Esse fato poderia justificar o porquê de não termos encontrado nenhuma modificação no peso relativo dos músculos avaliados no nosso estudo.

### **7.2.3 Polifenóis e resposta de expressão de genes relacionados ao metabolismo muscular**

O músculo esquelético tem uma notável capacidade de adaptar seu metabolismo em resposta à ingestão de nutrientes e às demandas energéticas do organismo (SMITH *et al.*, 2018). De fato, a privação alimentar favorece o uso de lipídios pelo músculo esquelético como fonte de energia em detrimento da glicose, fenômeno conhecido como flexibilidade metabólica (GOODPASTER e SPARKS, 2017; SMITH *et al.*, 2018). Sob essa condição de disponibilidade reduzida de glicose, ou seja, o jejum, há uma regulação positiva dos níveis de mRNA de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos (PILEGAARD, SALTIN e NEUFER, 2003; DE LANGE *et al.*, 2004; TSINTZAS *et al.*, 2006). Por exemplo, o jejum aumenta a expressão de mRNA do  $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase ( $\beta$ -*Had*) (SÁNCHEZ, PALOU e PICÓ 2009) e piruvato desidrogenase quinase 4 (PDK4) (PILEGAARD, SALTIN e NEUFER 2003, SÁNCHEZ, PALOU e PICÓ 2009), que estão envolvidos na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria e na inibição da oxidação da glicose, respectivamente (TSINTZAS *et al.*, 2006; YAO *et al.*, 2010; STEPHENSON *et al.*, 2012). Nesse sentido, nossos resultados mostram que o jejum de 24h foi capaz de aumentar a expressão do  $\beta$ -*Had* no músculo

sóleo dos animais Veículo em relação aos animais em status alimentado do mesmo grupo, o que pode caracterizar maior oxidação de ácidos graxos (ALEGRE *et al.*, 2020). No entanto, os animais Kaempferol<sub>24H</sub> e Resveratrol<sub>24H</sub> apresentaram menor expressão do  $\beta$ -Had em relação aos animais Veículo<sub>24H</sub>. No estudo de Carolo dos Santos (2014) ratos com diabetes tipo 1 tratados com resveratrol (1 mg/kg de peso/dia, gavagem), durante 30 dias, apresentaram diminuição da atividade do  $\beta$ -Had no músculo cardíaco, mostrando que o resveratrol tem a habilidade de diminuir a oxidação dos ácidos graxos como mecanismo de proteção. Por outro lado, no estudo de Lagouge *et al.* (2006), o resveratrol melhorou significativamente a capacidade oxidativa muscular em camundongos alimentados com dieta HF. A análise da expressão gênica no músculo gastrocnêmio mostrou aumento na oxidação de ácidos graxos, uma vez que a expressão de acil-CoA desidrogenase de cadeia média (MCAD) e da proteína desacopladora 3 (UCP3) foi aumentada e a utilização de glicose reduziu à medida que os níveis de PDK4 foram aumentados (LAUGOUGE *et al.*, 2006). Isso mostra que o resveratrol é capaz de alternar entre os substratos energéticos, sugerindo maior flexibilidade metabólica (LAUGOUGE *et al.*, 2006). Estudos mostram que o resveratrol é um polifenol capaz de modular o metabolismo energético e a função mitocondrial (BAUR *et al.*, 2006; LAUGOUGE *et al.*, 2006) e que teria efeito semelhante “mimético” à restrição calórica/alimentar (BARGER *et al.*, 2008; PEARSON *et al.*, 2008; CANTÓ e AUWERX, 2009; TIMMERS *et al.*, 2011), o que nos leva a pensar que o resveratrol e o jejum atuam nas mesmas vias metabólicas. Em nosso estudo, tanto o jejum de 24h como o resveratrol foram capazes de aumentar a expressão de PDK4 no músculo sóleo. A PDK4 é altamente expressa em tecidos que são capazes de oxidar elevadas taxas de ácidos graxos (SUGDEN e HOLNESS, 2006), como o músculo esquelético (SUGDEN *et al.*, 2000). Sob condição de privação alimentar, a PDK é ativada por aumento nas taxas de concentração de acetil-CoA/CoA e NADH/NAD<sup>+</sup> mitocondriais, ambas geradas pelo aumento na oxidação de ácidos graxos (SUGDEN e HOLNESS, 1994). Sugden e colaboradores (2000) observaram aumento significativo da expressão proteica de PDK4 no músculo sóleo (oxidativo) e no músculo tibial anterior (glicolítico) de ratas adultas, após jejum de 48h. No estudo de Frier e colaboradores (2011) o jejum noturno (~18h) aumentou a expressão de mRNA de PDK4 e da carnitina palmitoil

transferase 1 (CPT-1), e a expressão proteica de UCP-3 no músculo tríceps de ratos machos alimentados com dieta padrão de laboratório em relação aos animais do mesmo grupo de dieta no estado alimentado. Esses resultados corroboram que o jejum é capaz de induzir a expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético (FRIER *et al.*, 2011). Dentre os genes envolvidos com a regulação da oxidação de ácidos graxos está a CPT-1, uma enzima essencial que está envolvida na mediação da entrada de ácidos graxos através da membrana mitocondrial interna (DE LANGE *et al.*, 2006; SÁNCHEZ, PALOU e PICÓ 2009), enquanto, a UCP3 exporta ácidos graxos da mitocôndria quando a oxidação de ácidos graxos predomina (BEZAIRE *et al.*, 2005, MACLELLAN *et al.*, 2005) e participa na translocação de ácidos graxos peroxidados (GOGLIA e SKULACHEV 2003). Os efeitos do resveratrol no metabolismo lipídico em animais velhos saudáveis (não obesos) também foi relatado (GIMENO-MALLENCH *et al.*, 2019).

Embora nossos resultados tenham dado indícios de favorecer a flexibilidade metabólica pelo tratamento neonatal com polifenóis (com maior efeito para o polifenol resveratrol que o kaempferol) em ratos saudáveis em condição de jejum de 24h, nós não encontramos efeito na expressão do coativador gama 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (Pgc-1a) que de forma coordenada regula positivamente a expressão de vários genes desempenhando um papel fundamental na oxidação de ácidos graxos (PUIGSERVER e SPIEGELMAN 2003). A expressão da cadeia pesada de miosina 7 (Myh7), que define a formação das fibras do tipo I (oxidativas) e do FOXO1, membro da família de fatores de transcrição “*Forkhead box*” (FOXO) (SIN, YUNG e SIU 2015), que inibe a captação e utilização de glicose no músculo esquelético, também não foi evidenciada. Segundo De Lange et al. (2006) o músculo do rato possui a capacidade de ser rapidamente reprogramado a nível metabólico após diferentes períodos de jejum. Possivelmente, o tempo de jejum (24h) usado no nosso estudo tenha influenciado para a observação da expressão de apenas dois genes (b-Had e PDK) relacionados com o metabolismo lipídico a nível muscular.

## 8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo aceitamos nossa hipótese, visto que a administração neonatal de kaempferol ou resveratrol em ratos foi capaz de contribuir para o adequado crescimento somático, potencializar o desempenho locomotor e promover ajustes em parâmetros do comportamento alimentar (ponto de saciedade). Diante o desafio de jejum de 24 horas ambos polifenóis foram capazes de proteger o organismo dos animais e potencializar o uso de lipídeos como fonte de energia, evidenciado através do aumento da expressão de genes relacionados com a flexibilidade metabólica muscular.

### 8.1 PERSPECTIVAS

Nosso estudo fornece dados sobre os polifenóis (kaempferol ou resveratrol) no crescimento somático, desenvolvimento da locomoção, comportamento alimentar, perfil bioquímico, peso de órgãos e expressão de genes relacionados com a flexibilidade metabólica muscular em ratos saudáveis avaliados até a adolescência. Contudo, seria interessante que em futuros estudos os animais fossem acompanhados/avaliados até a vida adulta e a senescência. Além disso, o estudo da expressão gênica de neurotransmissores relacionados com o comportamento alimentar e a avaliação da tipagem da fibra muscular reforçaria nossos achados. Por último, nosso trabalho abre a possibilidade de estudar outros compostos bioativos e avaliar suas repercussões em ratos saudáveis e/ou com insultos nutricionais.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, S. et al. The Effect of Resveratrol Supplementation on Cardio-Metabolic Risk Factors in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized, Double-Blind Controlled Trial. **Phytother Res**, v. 33, n. 12, p. 3153-3162, Dec 2019.
- ADLOUNI, A. et al. Fasting during Ramadan induces a marked increase in high-density lipoprotein cholesterol and decrease in low-density lipoprotein cholesterol. **Ann Nutr Metab**, v. 41, n. 4, p. 242-249, 1997.
- ADLOUNI, A. et al. Beneficial effect on serum apo AI, apo B and Lp AI levels of Ramadan fasting. **Clin Chim Acta**, v. 271, n. 2, p. 179-189, Mar 23 1998.
- AHIMA, R. S.; ANTWI, D. A. Brain regulation of appetite and satiety. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 37, n. 4, p. 811-823, Dec 2008.
- ALBERDI, G. et al. Changes in white adipose tissue metabolism induced by resveratrol in rats. **Nutr Metab (Lond)**, v. 8, n. 1, p. 29, May 10 2011.
- ALEGRE, P. et al. Euterpe Oleracea Mart. (Açaí) Reduces Oxidative Stress and Improves Energetic Metabolism in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. **Arq Bras Cardiol**, v. 114, n. 1, p. 78-86, Jan 2020.
- ALFARADHI, M. Z.; OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. **Front Genet**, v. 2, p. 27, 2011.
- ALKHALIDY, H. et al. Kaempferol ameliorates hyperglycemia through suppressing hepatic gluconeogenesis and enhancing hepatic insulin sensitivity in diet-induced obese mice. **J Nutr Biochem**, v. 58, p. 90-101, Aug 2018.
- ALKHALIDY, H. et al. Small Molecule Kaempferol Promotes Insulin Sensitivity and Preserved Pancreatic  $\beta$ -Cell Mass in Middle-Aged Obese Diabetic Mice. **J Diabetes Res**, v. 2015, p. 532984, 2015.
- ANDRADE, J. M. et al. Resveratrol increases brown adipose tissue thermogenesis markers by increasing SIRT1 and energy expenditure and decreasing fat accumulation in adipose tissue of mice fed a standard diet. **Eur J Nutr**, v. 53, n. 7, p. 1503-1510, Oct 2014.
- ANTIN, J. et al. Cholecystokinin elicits the complete behavioral sequence of satiety in rats. **J Comp Physiol Psychol**, v. 89, n. 7, p. 784-790, Sep 1975.
- ARAGÃO RDA, S. et al. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents--a reproducibility study. **J Neurosci Methods**, v. 195, n. 2, p. 216-221, Feb 15 2011.
- ARFAOUI, L. J. M. Dietary plant polyphenols: Effects of food processing on their content and bioavailability. v. 26, n. 10, p. 2959, 2021.
- ARMITAGE, J. A. et al. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? **J Physiol**, v. 561, n. Pt 2, p. 355-377, Dec 1 2004.

ARMITAGE, J. A.; TAYLOR, P. D.; POSTON, L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. **J Physiol**, v. 565, n. Pt 1, p. 3-8, May 15 2005.

AZORÍN-ORTUÑO, M. et al. Pharmacokinetic study of trans-resveratrol in adult pigs. **J Agric Food Chem**, v. 58, n. 20, p. 11165-11171, Oct 27 2010.

BÂ, A.; SERI, B. V. Psychomotor functions in developing rats: ontogenetic approach to structure-function relationships. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 19, n. 3, p. 413-425, Fall 1995.

BAAR, K. Epigenetic control of skeletal muscle fibre type. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 199, n. 4, p. 477-487, Aug 2010.

BARET, P. et al. Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 45, n. 1, p. 167-174, Jan 2013.

BARGER, J. L. et al. A low dose of dietary resveratrol partially mimics caloric restriction and retards aging parameters in mice. **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. e2264, Jun 4 2008.

BARKER, D. J. Deprivation in infancy and risk of ischaemic heart disease. **Lancet**, v. 337, n. 8747, p. 981, Apr 20 1991.

\_\_\_\_\_. The developmental origins of adult disease. **Eur J Epidemiol**, v. 18, n. 8, p. 733-736, 2003.

\_\_\_\_\_. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, p. 412-417, May 2007.

BARVE, A. et al. Metabolism, oral bioavailability and pharmacokinetics of chemopreventive kaempferol in rats. **Biopharm Drug Dispos**, v. 30, n. 7, p. 356-365, Oct 2009.

BASHOLLI-SALIHU, M. et al. Bioconversion of piceid to resveratrol by selected probiotic cell extracts. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 39, n. 12, p. 1879-1885, Dec 2016.

BATESON, P. et al. Developmental plasticity and human health. **Nature**, v. 430, n. 6998, p. 419-421, Jul 22 2004.

BATHINA, S.; DAS, U. N. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. **Arch Med Sci**, v. 11, n. 6, p. 1164-1178, Dec 10 2015.

BATTAGLIA, G. M. et al. Effect of exercise training on metabolic flexibility in response to a high-fat diet in obese individuals. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 303, n. 12, p. E1440-1445, Dec 15 2012.

BAUR, J. A. et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 337-342, Nov 16 2006.

BAZHAN, N. et al. Sex Differences in Liver, Adipose Tissue, and Muscle Transcriptional Response to Fasting and Refeeding in Mice. **Cells**, v. 8, n. 12, Nov 27 2019.

BENTO-SANTOS, A. et al. Critérios para escolha da amostra em experimentos com ratos Wistar. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 1, p. 121-129, 2012.

BERNARDIS, L. L. Prediction of carcass fat, water and lean body mass from Lee's "nutritive ratio" in rats with hypothalamic obesity. **Experientia**, v. 26, n. 7, p. 789-790, 1970.

BÉZAIRE, V. et al. Effects of fasting on muscle mitochondrial energetics and fatty acid metabolism in Ucp3(-/-) and wild-type mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 281, n. 5, p. E975-982, Nov 2001.

BEZAIRE, V. et al. Constitutive UCP3 overexpression at physiological levels increases mouse skeletal muscle capacity for fatty acid transport and oxidation. **Faseb j**, v. 19, n. 8, p. 977-979, Jun 2005.

BHATT, J. K.; THOMAS, S.; NANJAN, M. J. Resveratrol supplementation improves glycemic control in type 2 diabetes mellitus. **Nutr Res**, v. 32, n. 7, p. 537-541, Jul 2012.

BJØRNDAL, B. et al. Different adipose depots: their role in the development of metabolic syndrome and mitochondrial response to hypolipidemic agents. **J Obes**, v. 2011, p. 490650, 2011.

BLAYLOCK, M. L. et al. Ucp3 expression during weight gain and loss, cold exposure, and fasting in the collared lemming. **Obes Res**, v. 12, n. 10, p. 1690-1697, Oct 2004.

BLUNDELL, J. E.; GOODSON, S.; HALFORD, J. C. Regulation of appetite: role of leptin in signalling systems for drive and satiety. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 25 Suppl 1, p. S29-34, May 2001.

BLUNDELL, J. E.; ROGERS, P. J.; HILL, A. J. Behavioural structure and mechanisms of anorexia: calibration of natural and abnormal inhibition of eating. **Brain Res Bull**, v. 15, n. 4, p. 371-376, Oct 1985.

BROCARD, F.; VINAY, L.; CLARAC, F. Development of hindlimb postural control during the first postnatal week in the rat. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 117, n. 1, p. 81-89, Oct 20 1999.

BROWN, V. A. et al. Repeat dose study of the cancer chemopreventive agent resveratrol in healthy volunteers: safety, pharmacokinetics, and effect on the insulin-like growth factor axis. **Cancer Res**, v. 70, n. 22, p. 9003-9011, Nov 15 2010.

BRYANT, N. J.; GOULD, G. W. Insulin stimulated GLUT4 translocation - Size is not everything! **Curr Opin Cell Biol**, v. 65, p. 28-34, Aug 2020.

BUSANELLO, A. et al. Resveratrol protects against a model of vacuous chewing movements induced by reserpine in mice. **Behav Pharmacol**, v. 22, n. 1, p. 71-75, Feb 2011.

BUSANELLO, A. et al. Resveratrol reduces vacuous chewing movements induced by acute treatment with fluphenazine. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 101, n. 2, p. 307-310, Apr 2012.

CADENA-BURBANO, E. V. et al. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. v. 22, n. 2, p. 98-109, 2019.

CALDERÓN-MONTAÑO, J. M. et al. A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini Rev Med Chem**, v. 11, n. 4, p. 298-344, Apr 2011.

CAMERON, N.; DEMERATH, E. W. Critical periods in human growth and their relationship to diseases of aging. **Am J Phys Anthropol**, v. Suppl 35, p. 159-184, 2002.

CAMPBELL, B. A.; TEGHTSOONIAN, R.; WILLIAMS, R. A. Activity, weight loss, and survival time of food-deprived rats as a function of age. **J Comp Physiol Psychol**, v. 54, p. 216-219, Apr 1961.

CAMPFIELD, L. A.; SMITH, F. J.; BURN, P. The OB protein (leptin) pathway--a link between adipose tissue mass and central neural networks. **Horm Metab Res**, v. 28, n. 12, p. 619-632, Dec 1996.

CANTÓ, C.; AUWERX, J. Caloric restriction, SIRT1 and longevity. **Trends Endocrinol Metab**, v. 20, n. 7, p. 325-331, Sep 2009.

CAROLO DOS SANTOS, K. et al. Cardiac energy metabolism and oxidative stress biomarkers in diabetic rat treated with resveratrol. **PLoS One**, v. 9, n. 7, p. e102775, 2014.

CHANG, C. J. et al. Kaempferol regulates the lipid-profile in high-fat diet-fed rats through an increase in hepatic PPAR $\alpha$  levels. **Planta Med**, v. 77, n. 17, p. 1876-1882, Nov 2011.

CHANG, H. C.; GUARENTE, L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 3, p. 138-145, Mar 2014.

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 Sci**, v. 259, p. 118224, Oct 15 2020.

CHEN, C. et al. SIRT1 and aging related signaling pathways. **Mech Ageing Dev**, v. 187, p. 111215, Apr 2020.

CHI, T. C. et al. Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. **Life Sci**, v. 80, n. 18, p. 1713-1720, Apr 10 2007.

CHIMENTO, A. et al. Progress to Improve Oral Bioavailability and Beneficial Effects of Resveratrol. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 6, Mar 19 2019.

CIANCIOSI, D. et al. The reciprocal interaction between polyphenols and other dietary compounds: Impact on bioavailability, antioxidant capacity and other physico-chemical and nutritional parameters. **Food Chem**, v. 375, p. 131904, May 1 2022.

CLARAC, F. et al. Role of gravity in the development of posture and locomotion in the neonatal rat. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 28, n. 1-2, p. 35-43, Nov 1998.

- CORNISH, E. R.; MROSOVSKY, N. Activity during food deprivation and satiation of six species of rodent. **Anim Behav**, v. 13, n. 2, p. 242-248, Apr-Jul 1965.
- CORY, H. et al. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. **Front Nutr**, v. 5, p. 87, 2018.
- COWLEY, M. A. et al. Integration of NPY, AGRP, and melanocortin signals in the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence of a cellular basis for the adipostat. **Neuron**, v. 24, n. 1, p. 155-163, Sep 1999.
- CROLL, S. D. et al. Expression of BDNF and trkB as a function of age and cognitive performance. **Brain Res**, v. 812, n. 1-2, p. 200-208, Nov 23 1998.
- CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Mol Aspects Med**, v. 31, n. 6, p. 446-467, Dec 2010.
- 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.
- DA SILVA ARAGÃO, R. et al. Maternal protein restriction impairs the transcriptional metabolic flexibility of skeletal muscle in adult rat offspring. **Br J Nutr**, v. 112, n. 3, p. 328-337, Aug 14 2014.
- DA SILVA, H. J. et al. Protocol of mensuration to avaliation of indicators of somatic development of Wistar rats. v. 23, n. 3, p. 227-230, 2005.
- DAL-PAN, A.; BLANC, S.; AUJARD, F. Resveratrol suppresses body mass gain in a seasonal non-human primate model of obesity. **BMC Physiol**, v. 10, p. 11, Jun 22 2010.
- DE LANGE, P. et al. Sequential changes in the signal transduction responses of skeletal muscle following food deprivation. **Faseb j**, v. 20, n. 14, p. 2579-2581, Dec 2006.
- DE LANGE, P. et al. Fuel economy in food-deprived skeletal muscle: signaling pathways and regulatory mechanisms. **Faseb j**, v. 21, n. 13, p. 3431-3441, Nov 2007.
- DE LANGE, P. et al. Combined cDNA array/RT-PCR analysis of gene expression profile in rat gastrocnemius muscle: relation to its adaptive function in energy metabolism during fasting. **Faseb j**, v. 18, n. 2, p. 350-352, Feb 2004.
- DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; PASSOS, M. C. Neonatal programming of neuroimmunomodulation--role of adipocytokines and neuropeptides. **Neuroimmunomodulation**, v. 15, n. 3, p. 176-188, 2008.
- DE SOUZA, J. A. et al. Early life stress induced by maternal separation during lactation alters the eating behavior and serotonin system in middle-aged rat female offspring. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 192, p. 172908, May 2020.
- DE VIENNE, D. What is a phenotype? History and new developments of the concept. **Genetica**, v. 150, n. 3-4, p. 153-158, Aug 2022.

- DEL RIO, D. et al. Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 14, p. 1818-1892, May 10 2013.
- DENG, J. Y. et al. Activation of estrogen receptor is crucial for resveratrol-stimulating muscular glucose uptake via both insulin-dependent and -independent pathways. **Diabetes**, v. 57, n. 7, p. 1814-1823, Jul 2008.
- DESAI, M.; HALES, C. N. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v. 72, n. 2, p. 329-348, May 1997.
- DEVI, K. P. et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. **Pharmacol Res**, v. 99, p. 1-10, Sep 2015.
- DI LORENZO, C. et al. Polyphenols and Human Health: The Role of Bioavailability. **Nutrients**, v. 13, n. 1, Jan 19 2021.
- DI MEO, F. et al. Bioactive Polyphenols and Neuromodulation: Molecular Mechanisms in Neurodegeneration. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 7, Apr 7 2020.
- DIMITRIADIS, G. et al. Insulin effects in muscle and adipose tissue. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 93 Suppl 1, p. S52-59, Aug 2011.
- DOBBING, J. The effect of undernutrition on myelination in the central nervous system. **Biol Neonat**, v. 9, n. 1, p. 132-147, 1965.
- \_\_\_\_\_. Undernutrition and the developing brain. The relevance of animal models to the human problem. **Am J Dis Child**, v. 120, n. 5, p. 411-415, Nov 1970.
- DUPONT, M. S. et al. Absorption of kaempferol from endive, a source of kaempferol-3-glucuronide, in humans. **Eur J Clin Nutr**, v. 58, n. 6, p. 947-954, Jun 2004.
- DUREGON, E. et al. Intermittent fasting: from calories to time restriction. **Geroscience**, v. 43, n. 3, p. 1083-1092, Jun 2021.
- DZIAŁO, M. et al. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 2, p. 160, Feb 18 2016.
- ELIAS, C. F. et al. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. **Neuron**, v. 23, n. 4, p. 775-786, Aug 1999.
- FAKHRZADEH, H. et al. Effect of Ramadan fasting on clinical and biochemical parameters in healthy adults. **Ann Saudi Med**, v. 23, n. 3-4, p. 223-226, May-Jul 2003.
- FANTE, T. et al. Diet-Induced Maternal Obesity Alters Insulin Signalling in Male Mice Offspring Rechallenged with a High-Fat Diet in Adulthood. **PLoS One**, v. 11, n. 8, p. e0160184, 2016.
- FELDMAN, F. et al. Efficacy of Polyphenols in the Management of Dyslipidemia: A Focus on Clinical Studies. **Nutrients**, v. 13, n. 2, Feb 19 2021.

- FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **Br J Nutr**, v. 109, n. 3, p. 449-456, Feb 14 2013.
- FLÜCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity--from gene to form and function. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 146, p. 159-216, 2003.
- FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Anim Behav**, v. 13, n. 2, p. 234-241, Apr-Jul 1965.
- FRAGA, C. G. et al. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. **Food Funct**, v. 10, n. 2, p. 514-528, Feb 20 2019.
- FRANCIOSO, A. et al. Chemistry, stability and bioavailability of resveratrol. **Med Chem**, v. 10, n. 3, p. 237-245, May 2014.
- FRANCO, J. G. et al. Resveratrol treatment rescues hyperleptinemia and improves hypothalamic leptin signaling programmed by maternal high-fat diet in rats. **Eur J Nutr**, v. 55, n. 2, p. 601-610, Mar 2016.
- FRANCO, J. G. et al. Resveratrol prevents hyperleptinemia and central leptin resistance in adult rats programmed by early weaning. **Horm Metab Res**, v. 46, n. 10, p. 728-735, Sep 2014.
- FRANCO, J. G. et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and prevents steatosis and hypertension in obese rats programmed by early weaning. **J Nutr Biochem**, v. 24, n. 6, p. 960-966, Jun 2013.
- FRIER, B. C. et al. Interactions between the consumption of a high-fat diet and fasting in the regulation of fatty acid oxidation enzyme gene expression: an evaluation of potential mechanisms. v. 300, n. 2, p. R212-R221, 2011.
- GALETTI, V. et al. Observational Study of Lipid Profile and C-Reactive Protein after a Seven-Day Fast. **Nutrients**, v. 13, n. 1, Jan 17 2021.
- GE, J.-F. et al. Resveratrol ameliorates the anxiety-and depression-like behavior of subclinical hypothyroidism rat: possible involvement of the HPT axis, HPA axis, and Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. v. 7, p. 44, 2016.
- GE, L. et al. Resveratrol abrogates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior, neuroinflammatory response, and CREB/BDNF signaling in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 768, p. 49-57, Dec 5 2015.
- GEE, J. M.; JOHNSON, I. T. Polyphenolic compounds: interactions with the gut and implications for human health. **Curr Med Chem**, v. 8, n. 11, p. 1245-1255, Sep 2001.
- GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BEEDLE, A. S. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. **Am J Hum Biol**, v. 19, n. 1, p. 1-19, Jan-Feb 2007.
- GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; PINAL, C. The developmental origins of adult disease. **Matern Child Nutr**, v. 1, n. 3, p. 130-141, Jul 2005.

GLUCKMAN, P. D. et al. Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 31, p. 12796-12800, Jul 31 2007.

GOGLIA, F.; SKULACHEV, V. P. A function for novel uncoupling proteins: antioxidant defense of mitochondrial matrix by translocating fatty acid peroxides from the inner to the outer membrane leaflet. **Faseb j**, v. 17, n. 12, p. 1585-1591, Sep 2003.

GONZALEZ, A. A. et al. Metabolic adaptations to fasting and chronic caloric restriction in heart, muscle, and liver do not include changes in AMPK activity. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 287, n. 5, p. E1032-1037, Nov 2004.

GOODPASTER, B. H.; SPARKS, L. M. Metabolic Flexibility in Health and Disease. **Cell Metab**, v. 25, n. 5, p. 1027-1036, May 2 2017.

GRAMSBERGEN, A. Posture and locomotion in the rat: independent or interdependent development? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, n. 4, p. 547-553, Jul 1998.

GRAMSBERGEN, A. et al. The activation of back muscles during locomotion in the developing rat. **Brain Res Dev Brain Res**, v. 112, n. 2, p. 217-228, Feb 5 1999.

GROSSO, G. Effects of Polyphenol-Rich Foods on Human Health. **Nutrients**, v. 10, n. 8, Aug 14 2018.

GRUNDMANN, O. et al. Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. **Phytomedicine**, v. 16, n. 4, p. 295-302, Apr 2009.

GRUNDMANN, O. et al. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test. **J Ethnopharmacol**, v. 110, n. 3, p. 406-411, Apr 4 2007.

GUAN, H. P. et al. Accelerated fatty acid oxidation in muscle averts fasting-induced hepatic steatosis in SJL/J mice. **J Biol Chem**, v. 284, n. 36, p. 24644-24652, Sep 4 2009.

HAHN, T. M. et al. Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. **Nat Neurosci**, v. 1, n. 4, p. 271-272, Aug 1998.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, n. 7, p. 595-601, Jul 1992.

HALFORD, J. C.; BLUNDELL, J. E. Metergoline antagonizes fluoxetine-induced suppression of food intake but not changes in the behavioural satiety sequence. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 54, n. 4, p. 745-751, Aug 1996.

HALFORD, J. C.; LAWTON, C. L.; BLUNDELL, J. E. The 5-HT<sub>2</sub> receptor agonist MK-212 reduces food intake and increases resting but prevents the behavioural satiety sequence. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 56, n. 1, p. 41-46, Jan 1997.

HALFORD, J. C.; WANNINAYAKE, S. C.; BLUNDELL, J. E. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 61, n. 2, p. 159-168, Oct 1998.

HANHINEVA, K. et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **Int J Mol Sci**, v. 11, n. 4, p. 1365-1402, Mar 31 2010.

HANSON, M.; GLUCKMAN, P. Developmental origins of noncommunicable disease: population and public health implications. **Am J Clin Nutr**, v. 94, n. 6 Suppl, p. 1754s-1758s, Dec 2011.

HARRIDGE, S. D. Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. **Exp Physiol**, v. 92, n. 5, p. 783-797, Sep 2007.

HE, J.; WATKINS, S.; KELLEY, D. E. Skeletal muscle lipid content and oxidative enzyme activity in relation to muscle fiber type in type 2 diabetes and obesity. **Diabetes**, v. 50, n. 4, p. 817-823, Apr 2001.

HEILBRONN, L. K. et al. Glucose tolerance and skeletal muscle gene expression in response to alternate day fasting. **Obes Res**, v. 13, n. 3, p. 574-581, Mar 2005.

HEMPENSTALL, S. et al. Dietary restriction increases skeletal muscle mitochondrial respiration but not mitochondrial content in C57BL/6 mice. **Mech Ageing Dev**, v. 133, n. 1, p. 37-45, Jan 2012.

HEWITT, K. N. et al. Serotonin 2C receptor agonists and the behavioural satiety sequence in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 71, n. 4, p. 691-700, Apr 2002.

HIRSCHEY, M. D. et al. SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 121-125, Mar 4 2010.

HOSEINI, A. et al. The effects of resveratrol on metabolic status in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary heart disease. **Food Funct**, v. 10, n. 9, p. 6042-6051, Sep 1 2019.

HOUTKOOPE, R. H.; PIRINEN, E.; AUWERX, J. Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 225-238, Mar 7 2012.

HUANG, A. C.; SHYU, B. C.; HSIAO, S. Dose-dependent dissociable effects of haloperidol on locomotion, appetitive responses, and consummatory behavior in water-deprived rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 95, n. 3, p. 285-291, May 2010.

HUANG, D. D. et al. A review on the potential of Resveratrol in prevention and therapy of diabetes and diabetic complications. **Biomed Pharmacother**, v. 125, p. 109767, May 2020.

HUNTER, R. G. et al. CART in feeding and obesity. **Trends Endocrinol Metab**, v. 15, n. 9, p. 454-459, Nov 2004.

IBRAHIM, M. et al. Alterations in rat adipose tissue transcriptome and proteome in response to prolonged fasting. **Biol Chem**, v. 401, n. 3, p. 389-405, Feb 25 2020.

IBRAHIM, N. et al. Hypothalamic proopiomelanocortin neurons are glucose responsive and express K(ATP) channels. **Endocrinology**, v. 144, n. 4, p. 1331-1340, Apr 2003.

ISHII, Y. et al. Effects of systematic variation in presatiation and fasting on the behavioural satiety sequence in male rats. **Physiol Behav**, v. 79, n. 2, p. 227-238, Jul 2003.

JAMDAR, S. C. Glycerolipid biosynthesis in rat adipose tissue. Influence of adipose-cell size and site of adipose tissue on triacylglycerol formation in lean and obese rats. **Biochem J**, v. 170, n. 1, p. 153-160, Jan 15 1978.

JAMON, M. J. C. R. P. The early development of motor control in neonate rat. v. 5, n. 3-4, p. 657-666, 2006.

JIAO, F.; GONG, Z. The Beneficial Roles of SIRT1 in Neuroinflammation-Related Diseases. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2020, p. 6782872, 2020.

JIMENEZ, M. et al. Expression of uncoupling protein-3 in subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria of various mouse muscle types and its modulation by fasting. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 12, p. 2878-2884, Jun 2002.

JORDAN, L. M. Initiation of locomotion in mammals. **Ann N Y Acad Sci**, v. 860, p. 83-93, Nov 16 1998.

JUAN, M. E. L. et al. Plasmatic levels of trans-resveratrol in rats. v. 35, n. 2-3, p. 195-199, 2002.

KADIOGLU, O. et al. Kaempferol Is an Anti-Inflammatory Compound with Activity towards NF- $\kappa$ B Pathway Proteins. **Anticancer Res**, v. 35, n. 5, p. 2645-2650, May 2015.

KARAM, H. M.; RADWAN, R. R. Low dose  $\gamma$  radiation enhances antidepressant effect of resveratrol: Behavioral and neurochemical studies. **Environ Toxicol**, v. 35, n. 10, p. 1137-1145, Oct 2020.

KELLEY, A. E. Locomotor activity and exploration. In: (Ed.). **Techniques in the behavioral and neural sciences**: Elsevier, v.10, 1993. p.499-518. ISBN 0921-0709.

KELLEY, D. E. et al. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. **Am J Physiol**, v. 277, n. 6, p. E1130-1141, Dec 1999.

KELLEY, D. E.; MANDARINO, L. J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. **Diabetes**, v. 49, n. 5, p. 677-683, May 2000.

KERNIE, S. G.; LIEBL, D. J.; PARADA, L. F. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. **Embo j**, v. 19, n. 6, p. 1290-1300, Mar 15 2000.

KIM, M. S. et al. Anti-obesity effects of alpha-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. **Nat Med**, v. 10, n. 7, p. 727-733, Jul 2004.

KIM, S. J. et al. Resveratrol, purified from the stem of *Vitis coignetiae* Pulliat, inhibits food intake in C57BL/6J Mice. **Arch Pharm Res**, v. 33, n. 5, p. 775-780, May 2010.

- KIM, S. O.; YUN, S. J.; LEE, E. H. The water extract of adlay seed (*Coix lachrymajobi* var. *mayuen*) exhibits anti-obesity effects through neuroendocrine modulation. **Am J Chin Med**, v. 35, n. 2, p. 297-308, 2007.
- KIM, Y.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Polyphenols and Glycemic Control. **Nutrients**, v. 8, n. 1, Jan 5 2016.
- KITAMURA, H. et al. Brazilian propolis ethanol extract and its component kaempferol induce myeloid-derived suppressor cells from macrophages of mice in vivo and in vitro. **BMC Complement Altern Med**, v. 18, n. 1, p. 138, May 2 2018.
- KOCH, W. Dietary Polyphenols-Important Non-Nutrients in the Prevention of Chronic Noncommunicable Diseases. A Systematic Review. **Nutrients**, v. 11, n. 5, May 9 2019.
- KOLA, B. et al. Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. **J Biol Chem**, v. 280, n. 26, p. 25196-25201, Jul 1 2005.
- KONG, L. et al. The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits. **Lipids Health Dis**, v. 12, p. 115, Jul 29 2013.
- LACERDA, D. C. et al. Metabolic and neurological consequences of the treatment with polyphenols: a systematic review in rodent models of noncommunicable diseases. **Nutr Neurosci**, v. 25, n. 8, p. 1680-1696, Aug 2022.
- LAGOUGE, M. et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1109-1122, Dec 15 2006a.
- LANDREE, L. E. et al. C75, a fatty acid synthase inhibitor, modulates AMP-activated protein kinase to alter neuronal energy metabolism. **J Biol Chem**, v. 279, n. 5, p. 3817-3827, Jan 30 2004.
- LI, S.; PU, X. P. Neuroprotective effect of kaempferol against a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 8, p. 1291-1296, 2011.
- LI, Z. G. et al. Suppression of N-nitrosomethylbenzylamine (NMBA)-induced esophageal tumorigenesis in F344 rats by resveratrol. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 9, p. 1531-1536, Sep 2002.
- LIN, J. et al. Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 797-801, Aug 15 2002.
- LIU, C. M.; KANOSKI, S. E. Homeostatic and non-homeostatic controls of feeding behavior: Distinct vs. common neural systems. **Physiol Behav**, v. 193, n. Pt B, p. 223-231, Sep 1 2018.
- LIU, D. et al. Resveratrol reverses the effects of chronic unpredictable mild stress on behavior, serum corticosterone levels and BDNF expression in rats. **Behav Brain Res**, v. 264, p. 9-16, May 1 2014.

LIU, T. et al. Resveratrol ameliorates estrogen deficiency-induced depression- and anxiety-like behaviors and hippocampal inflammation in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 236, n. 4, p. 1385-1399, Apr 2019.

LOH, K. et al. Insulin controls food intake and energy balance via NPY neurons. **Mol Metab**, v. 6, n. 6, p. 574-584, Jun 2017.

LOMMATZSCH, M. et al. The impact of age, weight and gender on BDNF levels in human platelets and plasma. **Neurobiol Aging**, v. 26, n. 1, p. 115-123, Jan 2005.

LONG, Y. C. et al. Role of AMP-activated protein kinase in the coordinated expression of genes controlling glucose and lipid metabolism in mouse white skeletal muscle. **Diabetologia**, v. 48, n. 11, p. 2354-2364, Nov 2005.

LONGO, V. D.; MATTSON, M. P. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. **Cell Metab**, v. 19, n. 2, p. 181-192, Feb 4 2014.

LÓPEZ-SOLDADO, I. et al. Maintenance of liver glycogen during long-term fasting preserves energy state in mice. **FEBS Lett**, v. 594, n. 11, p. 1698-1710, Jun 2020.

LUCA, S. V. et al. Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 60, n. 4, p. 626-659, 2020.

LUKAS, G.; BRINDLE, S. D.; GREENGARD, P. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 178, n. 3, p. 562-564, Sep 1971.

LUO, C. et al. Kaempferol alleviates insulin resistance via hepatic IKK/NF- $\kappa$ B signal in type 2 diabetic rats. **Int Immunopharmacol**, v. 28, n. 1, p. 744-750, Sep 2015.

LUPU, F. et al. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. **Dev Biol**, v. 229, n. 1, p. 141-162, Jan 1 2001.

LUQUET, S. et al. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 683-685, Oct 28 2005.

MACARULLA, M. T. et al. Effects of different doses of resveratrol on body fat and serum parameters in rats fed a hypercaloric diet. **J Physiol Biochem**, v. 65, n. 4, p. 369-376, Dec 2009.

MACLELLAN, J. D. et al. Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. **Diabetes**, v. 54, n. 8, p. 2343-2350, Aug 2005.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 5, p. 727-747, May 2004.

MANZANO, S.; WILLIAMSON, G. Polyphenols and phenolic acids from strawberry and apple decrease glucose uptake and transport by human intestinal Caco-2 cells. **Mol Nutr Food Res**, v. 54, n. 12, p. 1773-1780, Dec 2010.

- 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.
- MARIER, J. F. et al. Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 302, n. 1, p. 369-373, Jul 2002.
- MCCRIMMON, R. J. et al. Potential role for AMP-activated protein kinase in hypoglycemia sensing in the ventromedial hypothalamus. **Diabetes**, v. 53, n. 8, p. 1953-1958, Aug 2004.
- MINOKOSHI, Y. et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 569-574, Apr 1 2004.
- MIRANDA, M. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Key Molecule for Memory in the Healthy and the Pathological Brain. **Front Cell Neurosci**, v. 13, p. 363, 2019.
- MONTERO, M. et al. Effects of long-term feeding of the polyphenols resveratrol and kaempferol in obese mice. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e112825, 2014.
- MORADI-AFRAPOLI, F. et al. Validation of UHPLC-MS/MS methods for the determination of kaempferol and its metabolite 4-hydroxyphenyl acetic acid, and application to in vitro blood-brain barrier and intestinal drug permeability studies. **J Pharm Biomed Anal**, v. 128, p. 264-274, Sep 5 2016.
- MORENO, M. et al. Fasting, lipid metabolism, and triiodothyronine in rat gastrocnemius muscle: interrelated roles of uncoupling protein 3, mitochondrial thioesterase, and coenzyme Q. **Faseb j**, v. 17, n. 9, p. 1112-1114, Jun 2003.
- MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 17, n. 1, p. 91-128, Spring 1993.
- MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, n. 4, p. 471-483, Jun 2002.
- MUIR, G. D. Early ontogeny of locomotor behaviour: a comparison between altricial and precocial animals. **Brain Res Bull**, v. 53, n. 5, p. 719-726, Nov 15 2000.
- MUOIO, D. M. Metabolic inflexibility: when mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1253-1262, Dec 4 2014.
- NEUMANN-HAEFELIN, C. et al. Muscle-type specific intramyocellular and hepatic lipid metabolism during starvation in wistar rats. **Diabetes**, v. 53, n. 3, p. 528-534, Mar 2004.
- NOVELLI, E. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. v. 41, n. 1, p. 111-119, 2007.
- NUNES, S. et al. Resveratrol and inflammatory bowel disease: the evidence so far. **Nutr Res Rev**, v. 31, n. 1, p. 85-97, Jun 2018.
- OLIVEIRA, L. D. S.; SOUZA, S. L. D.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. J. R. D. N. Behavioral satiety sequence: an experimental model for studying feeding behavior. v. 24, p. 619-628, 2011.

ORGANIZATION, W. H. **Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation.** World Health Organization, 2003. ISBN 924120916X.

OROZCO-SÓLIS, R. et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiol Behav**, v. 96, n. 3, p. 481-492, Mar 2 2009.

OUCHI, N. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. **Circulation**, v. 100, n. 25, p. 2473-2476, Dec 21-28 1999.

PALOU, M. et al. Regional differences in the expression of genes involved in lipid metabolism in adipose tissue in response to short- and medium-term fasting and refeeding. **J Nutr Biochem**, v. 21, n. 1, p. 23-33, Jan 2010.

PALSAMY, P.; SUBRAMANIAN, S. Ameliorative potential of resveratrol on proinflammatory cytokines, hyperglycemia mediated oxidative stress, and pancreatic beta-cell dysfunction in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. **J Cell Physiol**, v. 224, n. 2, p. 423-432, Aug 2010.

PANICKAR, K. S. Effects of dietary polyphenols on neuroregulatory factors and pathways that mediate food intake and energy regulation in obesity. **Mol Nutr Food Res**, v. 57, n. 1, p. 34-47, Jan 2013.

PATEL, C. A.; ACHARYA, S. R. J. I. J. O. P. R.; THERAPEUTICS. Energy homeostasis and obesity: The therapeutic role of anorexigenic and orexigenic peptide. v. 25, n. 3, p. 919-932, 2019.

PEARSON, K. J. et al. Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. **Cell Metab**, v. 8, n. 2, p. 157-168, Aug 2008.

PEÑA-VILLALOBOS, I. et al. Costs of exploratory behavior: the energy trade-off hypothesis and the allocation model tested under caloric restriction. **Sci Rep**, v. 10, n. 1, p. 4156, Mar 5 2020.

PETTE, D.; STARON, R. S. **Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers.** Springer, 1990. ISBN 3540528806.

PILEGAARD, H.; SALTIN, B.; NEUFER, P. D. Effect of short-term fasting and refeeding on transcriptional regulation of metabolic genes in human skeletal muscle. **Diabetes**, v. 52, n. 3, p. 657-662, Mar 2003.

PLANAS, J. M. et al. The bioavailability and distribution of trans-resveratrol are constrained by ABC transporters. **Arch Biochem Biophys**, v. 527, n. 2, p. 67-73, Nov 15 2012.

PUNKT, K.; NAUPERT, A.; ASMUSSEN, G. Differentiation of rat skeletal muscle fibres during development and ageing. **Acta Histochem**, v. 106, n. 2, p. 145-154, 2004.

QIN, C.; LI, J.; TANG, K. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Development, Function, and Human Diseases. **Endocrinology**, v. 159, n. 9, p. 3458-3472, Sep 1 2018.

- RAPOSINHO, P. D. et al. Chronic administration of neuropeptide Y into the lateral ventricle of C57BL/6J male mice produces an obesity syndrome including hyperphagia, hyperleptinemia, insulin resistance, and hypogonadism. **Mol Cell Endocrinol**, v. 185, n. 1-2, p. 195-204, Dec 20 2001.
- REN, J. et al. Recent progress regarding kaempferol for the treatment of various diseases. **Exp Ther Med**, v. 18, n. 4, p. 2759-2776, Oct 2019.
- RIVERA, L. et al. Long-term resveratrol administration reduces metabolic disturbances and lowers blood pressure in obese Zucker rats. **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 6, p. 1053-1063, Mar 15 2009.
- ROH, E.; KIM, M. S. Brain Regulation of Energy Metabolism. **Endocrinol Metab (Seoul)**, v. 31, n. 4, p. 519-524, Dec 2016.
- ROMERO-JUÁREZ, P. A. et al. Dietary flavonoid kaempferol reduces obesity-associated hypothalamic microglia activation and promotes body weight loss in mice with obesity. **Nutr Neurosci**, v. 26, n. 1, p. 25-39, Jan 2023.
- RUDERMAN, N. B. et al. Lipid abnormalities in muscle of insulin-resistant rodents. The malonyl CoA hypothesis. **Ann N Y Acad Sci**, v. 827, p. 221-230, Sep 20 1997.
- RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Compr Physiol**, v. 4, n. 1, p. 177-197, Jan 2014.
- SAHA, A. K. et al. Malonyl-CoA regulation in skeletal muscle: its link to cell citrate and the glucose-fatty acid cycle. **Am J Physiol**, v. 272, n. 4 Pt 1, p. E641-648, Apr 1997.
- SAHU, A. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. **Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 2613-2620, Jun 2004.
- SALTIN, B.; GOLLNICK, P. D. J. C. P. Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance. p. 555-631, 2010.
- SAMEC, S. et al. Skeletal muscle heterogeneity in fasting-induced upregulation of genes encoding UCP2, UCP3, PPARgamma and key enzymes of lipid oxidation. **Pflugers Arch**, v. 445, n. 1, p. 80-86, Oct 2002.
- SANCHES-SILVA, A. et al. Therapeutic potential of polyphenols in cardiovascular diseases: Regulation of mTOR signaling pathway. **Pharmacol Res**, v. 152, p. 104626, Feb 2020.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in mammalian skeletal muscles. **Physiol Rev**, v. 91, n. 4, p. 1447-1531, Oct 2011.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. J. J. O. A. P. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. v. 77, n. 2, p. 493-501, 1994.
- SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-671, Apr 6 2000.
- SCOTT, V. et al. Intravenous peptide YY3-36 and Y2 receptor antagonism in the rat: effects on feeding behaviour. **J Neuroendocrinol**, v. 17, n. 7, p. 452-457, Jul 2005.

SHANG, J. et al. Resveratrol improves non-alcoholic fatty liver disease by activating AMP-activated protein kinase. **Acta Pharmacol Sin**, v. 29, n. 6, p. 698-706, Jun 2008.

SHEHAB, A. et al. Favorable changes in lipid profile: the effects of fasting after Ramadan. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e47615, 2012.

SHIBATA, N. et al. Regulation of hepatic cholesterol synthesis by a novel protein (SPF) that accelerates cholesterol biosynthesis. **Faseb j**, v. 20, n. 14, p. 2642-2644, Dec 2006.

SINNAMON, H. M. Preoptic and hypothalamic neurons and the initiation of locomotion in the anesthetized rat. **Prog Neurobiol**, v. 41, n. 3, p. 323-344, Sep 1993.

SLOLEY, B. et al. Identification of kaempferol as a monoamine oxidase inhibitor and potential neuroprotectant in extracts of Ginkgo biloba leaves. v. 52, n. 4, p. 451-459, 2000.

SMITH, R. L. et al. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. **Endocr Rev**, v. 39, n. 4, p. 489-517, Aug 1 2018.

STEPHENSON, E. J. et al. Skeletal muscle respiratory capacity is enhanced in rats consuming an obesogenic Western diet. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 302, n. 12, p. E1541-1549, Jun 15 2012.

STEVANOVIC, T.; DIOUF, P. N.; GARCÍA-PÉREZ, M. E. Bioactive polyphenols from healthy diets and forest biomass. **Current Nutrition & Food Science**, v. 5, p. 264-295, 2009.

STORLIEN, L. H. The role of the ventromedial hypothalamic area in periprandial glucoregulation. **Life Sci**, v. 36, n. 6, p. 505-514, Feb 11 1985.

SU, D. et al. Comparison of piceid and resveratrol in antioxidation and antiproliferation activities in vitro. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e54505, 2013.

SU, H. C.; HUNG, L. M.; CHEN, J. K. Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 6, p. E1339-1346, Jun 2006.

SUGDEN, M. C.; HOLNESS, M. J. Interactive regulation of the pyruvate dehydrogenase complex and the carnitine palmitoyltransferase system. **Faseb j**, v. 8, n. 1, p. 54-61, Jan 1994.

\_\_\_\_\_. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. **Arch Physiol Biochem**, v. 112, n. 3, p. 139-149, Jul 2006.

SUGDEN, M. C. et al. Fibre-type specific modification of the activity and regulation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) by prolonged starvation and refeeding is associated with targeted regulation of PDK isoenzyme 4 expression. **Biochem J**, v. 346 Pt 3, n. Pt 3, p. 651-657, Mar 15 2000.

SZKUDELSKI, T. Resveratrol inhibits insulin secretion from rat pancreatic islets. **Eur J Pharmacol**, v. 552, n. 1-3, p. 176-181, Dec 15 2006.

TANNER, C. J. et al. Muscle fiber type is associated with obesity and weight loss. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 282, n. 6, p. E1191-1196, Jun 2002.

TAO, C.; SIFUENTES, A.; HOLLAND, W. L. Regulation of glucose and lipid homeostasis by adiponectin: effects on hepatocytes, pancreatic  $\beta$  cells and adipocytes. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 28, n. 1, p. 43-58, Jan 2014.

TAYLOR, P. D.; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Exp Physiol**, v. 92, n. 2, p. 287-298, Mar 2007.

TIMMERS, S. et al. Calorie restriction-like effects of 30 days of resveratrol supplementation on energy metabolism and metabolic profile in obese humans. **Cell Metab**, v. 14, n. 5, p. 612-622, Nov 2 2011.

TOMÉ-CARNEIRO, J. et al. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. **Curr Pharm Des**, v. 19, n. 34, p. 6064-6093, 2013.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231-1246, Dec 2010.

TSINTZAS, K. et al. Differential regulation of metabolic genes in skeletal muscle during starvation and refeeding in humans. **J Physiol**, v. 575, n. Pt 1, p. 291-303, Aug 15 2006.

TUNSTALL, R. J. et al. Fasting activates the gene expression of UCP3 independent of genes necessary for lipid transport and oxidation in skeletal muscle. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 294, n. 2, p. 301-308, Jun 7 2002.

TURNER, P. V. et al. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **J Am Assoc Lab Anim Sci**, v. 50, n. 5, p. 600-613, Sep 2011.

UM, J. H. et al. AMP-activated protein kinase-deficient mice are resistant to the metabolic effects of resveratrol. **Diabetes**, v. 59, n. 3, p. 554-563, Mar 2010.

VALBERG, S. J. Skeletal muscle function. In: (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**: Elsevier Inc., 2008. p.459-484.

VELLOSO, C. P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. **Br J Pharmacol**, v. 154, n. 3, p. 557-568, Jun 2008.

VINAY, L. et al. Perinatal development of the motor systems involved in postural control. **Neural Plast**, v. 12, n. 2-3, p. 131-139; discussion 263-172, 2005.

VINAYAGAM, R.; JAYACHANDRAN, M.; XU, B. Antidiabetic Effects of Simple Phenolic Acids: A Comprehensive Review. **Phytother Res**, v. 30, n. 2, p. 184-199, Feb 2016.

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutr Metab (Lond)**, v. 12, p. 60, 2015.

VISSIENNON, C. et al. Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin--are they prodrugs? **J Nutr Biochem**, v. 23, n. 7, p. 733-740, Jul 2012.

WALKER, C. D. Nutritional aspects modulating brain development and the responses to stress in early neonatal life. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 29, n. 8, p. 1249-1263, Dec 2005.

WALLE, T. et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metab Dispos**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, Dec 2004.

WALLE, T. J. A. O. T. N. Y. A. O. S. Bioavailability of resveratrol. v. 1215, n. 1, p. 9-15, 2011.

WANG, F. M.; YAO, T. W.; ZENG, S. Determination of quercetin and kaempferol in human urine after orally administrated tablet of ginkgo biloba extract by HPLC. **J Pharm Biomed Anal**, v. 33, n. 2, p. 317-321, Sep 19 2003.

WANG, Y. X. et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. **PLoS Biol**, v. 2, n. 10, p. e294, Oct 2004.

WANG, Z. et al. Antidepressant-like activity of resveratrol treatment in the forced swim test and tail suspension test in mice: the HPA axis, BDNF expression and phosphorylation of ERK. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 112, p. 104-110, Nov 2013.

WASHIO, K.; SHIMAMOTO, Y.; KITAMURA, H. Brazilian propolis extract increases leptin expression in mouse adipocytes. **Biomed Res**, v. 36, n. 5, p. 343-346, 2015.

WATERSON, M. J.; HORVATH, T. L. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. **Cell Metab**, v. 22, n. 6, p. 962-970, Dec 1 2015.

WEINDRUCH, R.; SOHAL, R. S. J. N. E. J. O. M. Caloric intake and aging. v. 337, n. 14, p. 986-994, 1997.

WELLS, J. C. Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities. **Am J Hum Biol**, v. 22, n. 1, p. 1-17, Jan-Feb 2010.

WEN, K. et al. Recent Research on Flavonoids and their Biomedical Applications. **Curr Med Chem**, v. 28, n. 5, p. 1042-1066, 2021.

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 83, n. 5, p. 1388-1392, Mar 1986.

\_\_\_\_\_. Developmental plasticity and the origin of species differences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 6543-6549, May 3 2005.

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.

- WILLIAMS, T. D. et al. Cardiovascular responses to caloric restriction and thermoneutrality in C57BL/6J mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 5, p. R1459-1467, May 2002.
- 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.
- YANAGI, S. et al. The Homeostatic Force of Ghrelin. **Cell Metab**, v. 27, n. 4, p. 786-804, Apr 3 2018.
- YÁÑEZ, M. et al. Inhibitory effects of cis- and trans-resveratrol on noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake and on monoamine oxidase activity. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 344, n. 2, p. 688-695, Jun 2 2006.
- YANG, C. et al. Kaempferol Alleviates Oxidative Stress and Apoptosis Through Mitochondria-dependent Pathway During Lung Ischemia-Reperfusion Injury. **Front Pharmacol**, v. 12, p. 624402, 2021.
- YAO, J. et al. Decline in mitochondrial bioenergetics and shift to ketogenic profile in brain during reproductive senescence. **Biochim Biophys Acta**, v. 1800, n. 10, p. 1121-1126, Oct 2010.
- ZABELA, V. et al. Pharmacokinetics of dietary kaempferol and its metabolite 4-hydroxyphenylacetic acid in rats. **Fitoterapia**, v. 115, p. 189-197, Dec 2016.
- ZAMORA-ROS, R. et al. Dietary polyphenol intake and their major food sources in the Mexican Teachers' Cohort. **Br J Nutr**, v. 120, n. 3, p. 353-360, Aug 2018.
- ZANATTA, L. et al. Insulinomimetic effect of kaempferol 3-neohesperidoside on the rat soleus muscle. **J Nat Prod**, v. 71, n. 4, p. 532-535, Apr 2008.
- ZHU, W. et al. Effects of random food deprivation on body mass, behavior and serum leptin levels in *Eothenomys miletus* (Mammalia: Rodentia: Cricetidae). v. 81, n. 2, p. 227-234, 2014.

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Universidade Federal de Pernambuco  
 Centro de Biotécias  
 Av. Prof. Nelson Chaves, 470  
 50670-420 / Recife - PE - Brasil  
 Fone: 2126 5543  
 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 Vitória  
 Universidade Federal de Pernambuco  
 Processo nº 0052/2019

Certificamos que a proposta intitulada "Diets hiperlipídicas hipercalórica maternas com ou sem o uso de kaempferol: Repercussões sobre a flexibilidade metabólica da prole 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	Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério de experimentação no Lab. de estudo em Nutrição e instrumentação Biomédica da (LENIB/UFPE)

Atenciosamente,