

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**  
**Departamento de Bioquímica Professor Tuiskon Dick**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

**A suplementação pré-natal com naringina altera a  
homeostase redox e função mitocondrial cerebral da  
prole de ratas Wistar**

**Bernardo Gindri dos Santos**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristiane Matté

Porto Alegre, 2018

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**  
**Instituto de Ciências Básicas da Saúde**  
**Departamento de Bioquímica Professor Tuiskon Dick**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica**

**A suplementação pré-natal com naringina altera a homeostase redox e função mitocondrial cerebral da prole de ratas Wistar**

Bernardo Gindri dos Santos

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristiane Matté

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito à obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre, 2018

### CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Bernardo Gindri

A suplementação pré-natal com naringina altera a homeostase redox e função mitocondrial cerebral da prole de ratas Wistar / Bernardo Gindri dos Santos. -  
- 2018.

123 f.

Orientadora: Cristiane Matté.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Flavonoides. 2. Naringina. 3. Gestação. 4. Programação Metabólica. 5. Homeostase redox. I. Matté, Cristiane, orient. II. Título.

## **Agradecimentos**

Assim como a ciência, acredito que a vida é colaborativa: estamos a todo o momento observando, discutindo e aprendendo junto a outras pessoas, independentemente do quanto esse aprendizado modifica nossas vidas. Dessa forma, minha trajetória antes e durante o desenvolvimento desse trabalho também foi cheia de diversas colaborações, de tal modo que quero deixar aqui registrado o quão grato sou por tudo que pude aprender e viver com vocês.

Sou imensamente grato aos meus pais, Eneida e Jairo, e também a meu irmão Henrique, por todo apoio em minhas escolhas, mas principalmente pela paciência e compreensão devido aos longos períodos longe de casa, principalmente durante a realização do mestrado.

Aos meus tios Narlei e Nilo, por todo o suporte, cuidado e carinho durante minha trajetória em Porto Alegre.

À minha orientadora Cristiane, não apenas pela oportunidade que me deu de trabalhar junto ao grupo de pesquisa, mas também por todo cuidado e empenho que tens ao ensinar todos os alunos do grupo, nos proporcionando um ambiente de grande crescimento profissional e pessoal.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa: Caroline, Pauline, Vinícius, Mariana Scortegagna, Régis, Juliana, Karoline, Felippo, André, Bárbara, Luanda, Rafael, Alice e Mariana Maier por todos os momentos de trabalho e de lazer que pude estar na companhia de vocês.

Aos meus amigos de longa data: Eduarda, Estephanea, Nicole, Rianne, Caroline, Mariane, Raphael, Rossani, Arthur, Diego, Vanessa, Ketson, Mariana, Felipe e Danilo por toda compreensão, paciência e amizade.

Ao Lucas, Bernardo, Ritiele, Júlio, Iana, Renata e Roberta, minha família porto alegreense.

Ao Jonas, por todo cuidado, paciência e amor.

Aos colegas da pós-graduação, por toda parceria e troca de ideias pelos corredores do departamento.

A UFRGS, não apenas pela excelência no ensino, mas também por ser um lugar de reflexão, tolerância e de luta. Que seja cada vez mais diversa.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e do biotério, em especial a Fabíola e Letícia, por todo auxílio nos acasalamentos dos animais para este projeto.

Por fim, agradecer as agências de fomento CAPES, CNPq, PROPESQ e FAPERGS por todo apoio financeiro.

*“Train yourself to let go of everything you fear to lose”*

Mestre Yoda

Star Wars Episódio III: A Vingança dos Sith

## Resumo

Diversos trabalhos vêm demonstrando que a suplementação com naringina é capaz de promover a neuroproteção em modelos de doenças neurodegenerativas induzidos em animais, principalmente através da regulação da homeostase redox e função mitocondrial. Embora a naringina possa ser considerada como uma possível abordagem terapêutica nesses modelos, ainda se desconhecem os efeitos que essa suplementação pode ter quando realizada durante a gestação no desenvolvimento fetal. Dessa forma, nós buscamos avaliar o efeito da suplementação com naringina durante a gestação sobre a homeostase redox e a função mitocondrial no encéfalo de filhotes fêmeas, além de investigar parâmetros de desenvolvimento pós-natal e memória nos filhotes machos nascidos de ratas que foram suplementadas. Assim, ratas Wistar prenhas foram divididas em dois grupos: (1) controle e (2) naringina, que foi administrada na dose de 100 mg/kg/dia por via oral durante toda a prenhez. Após o nascimento, as filhotes fêmeas foram eutanasiadas nos dias pós-natais 1, 7 e 21, e córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado e cerebelo foram coletados para análises bioquímicas. Os filhotes machos tiveram seu desenvolvimento pós-natal avaliado durante as duas primeiras semanas depois do nascimento, entre os dias pós-natais 2 e 15, além de serem submetidos a testes comportamentais no dia pós-natal 21. Nossos resultados demonstraram que a suplementação com naringina durante a gestação alterou a homeostase redox e a função mitocondrial no encéfalo das fêmeas de uma forma específica em cada estrutura e que essas alterações também foram dependentes da idade avaliada, já que a maior intensidade de efeitos foi observada nos dias pós-natais 1 e 7, e reduziram-se progressivamente até o dia pós-natal 21, exceto no cerebelo, que manteve um número elevado de alterações até essa idade, demonstrando ser mais susceptível aos efeitos do consumo materno de naringina durante a gestação. Os filhotes machos não apresentaram alterações significativas tanto em seu desenvolvimento durante as duas primeiras semanas após o nascimento quanto no desempenho nos testes comportamentais para avaliação da função mnemônica no dia pós-natal 21. Dessa forma, concluímos que a suplementação com naringina durante a gestação pode ser prejudicial ao desenvolvimento do sistema nervoso central em relação à homeostase redox e à função mitocondrial, especialmente no cerebelo, visto que essa suplementação foi capaz de desencadear diversas alterações bioquímicas. Se nossos dados puderem ser extrapolados para a clínica, sugerimos atenção ao consumo e suplementação com polifenóis durante o período gestacional, considerando os possíveis efeitos deletérios sobre o cérebro em desenvolvimento.

## **Abstract**

Several studies have been demonstrating that naringin supplementation promotes neuroprotection when used in animal models of neurodegenerative diseases, especially by regulating redox homeostasis and mitochondrial function. However, despite naringin use as a potential therapeutic approach in those models, there is no data concerning the effects of naringin supplementation during pregnancy on fetal development. Thereby, we sought to evaluate the effects of maternal naringin supplementation during pregnancy on redox homeostasis and mitochondrial function in female pups' brain, as well as on postnatal development and memory of male pups. Thus, pregnant Wistar rats were divided into two groups: (1) control and (2) naringin, which was supplemented by oral gavage in a dose of 100 mg/kg/day during entire pregnancy. After birth, female pups were euthanized on postnatal days 1, 7 and 21, and prefrontal cortex, hippocampus, striatum, and cerebellum were dissected for biochemical essays. Male pups were used to asses postnatal development during the first two weeks after birth, between postnatal days 2 and 15, and were submitted to behavioral test on postnatal day 21. Our results demonstrated that naringin supplementation during pregnancy altered redox homeostasis and mitochondrial function in brain of female pups in a structure specific manner, and that these alterations were also time-dependent, since most alterations were found on postnatal days 1 and 7, and progressively declined until postnatal day 21, except the cerebellum, which demonstrated an increased number of alterations until the last age, suggesting a higher susceptibility of this brain structure to the programming effects triggered by maternal naringin supplementation during gestation. Moreover, male pups did not demonstrate any significant alteration during postnatal development on the first two weeks after birth or on behavioral tests on postnatal day 21. Thereby, maternal naringin supplementation during pregnancy might be detrimental to the central nervous system development when considering redox homeostasis and mitochondrial function, especially on cerebellum, since naringin supplementation triggered several biochemical alterations. Whether our data could be considered for clinical purposes, we suggest attention to polyphenol consumption and supplementation during pregnancy, considering the high impact on brain metabolism during development.

## **Lista de abreviaturas**

ATP - Adenosina trifosfato

ADP - Adenosina difosfato

CAT - Catalase

CYP450 - Citocromo P450

DCFH - Diclorofluoresceína

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ERN - Espécies reativas de nitrogênio

FADH<sub>2</sub> - Flavina adenina dinucleotídeo reduzido

GLO1 - Glioxalase 1

Grx - Glutarredoxina

GPx - Glutaciona-peroxidase

GSH - Glutaciona reduzida

GSSG - Glutaciona oxidada

MG - Metilglioxal

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADH.H<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NOS - Óxido-nítrico-sintase

NOX - NADPH-oxidase

PND - Dia pós-natal

SNC - Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido-dismutase

STEM - Sistema de transporte de elétrons mitocondrial

TrxR - Tiorredoxina-redutase



## **Lista de Figuras**

**Figura 1** – Estrutura química comum aos flavonoides.

**Figura 2** – Estrutura química da naringina.

**Figura 3** – Esquema ilustrando as reações químicas catalisadas pelo sistema das enzimas glioxalases.

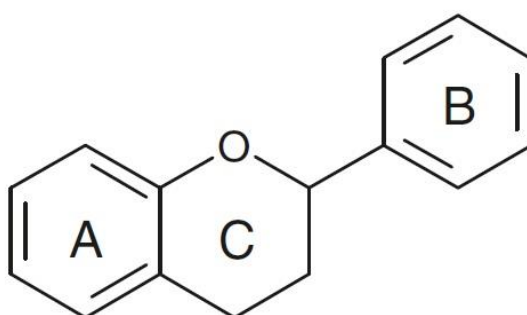
## Sumário

1. Introdução.....	1
1.1. Flavonoides e Naringina.....	1
1.2. Oxigênio e metabolismo mitocondrial.....	3
1.3. Homeostase redox e estresse oxidativo.....	5
1.4. Memória .....	14
1.5. Programação metabólica fetal e consumo de polifenóis durante a gestação .....	16
2. Objetivos.....	18
2.1. Objetivo geral .....	18
2.2. Objetivos específicos .....	18
3. Resultados.....	20
3.1. Capítulo I.....	20
3.2. Capítulo II.....	37
4. Discussão .....	79
5. Conclusões .....	92
6. Perspectivas .....	93
Referências .....	94
Anexos .....	110
Anexo I – Carta de Aprovação da CEUA .....	110
Anexo II – Normas de Publicação do Periódico Científico Free Radical Research.....	111

## 1. Introdução

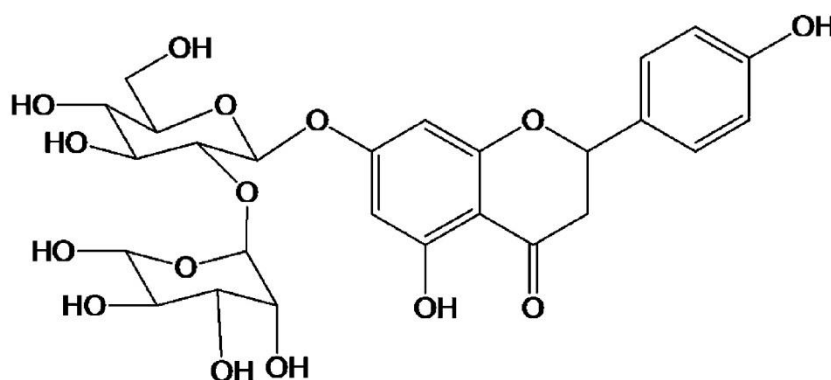
### 1.1. Flavonoides e Naringina

Os flavonoides são metabólitos secundários de plantas e estão amplamente distribuídos em diversos vegetais, frutas e seus derivados, como sucos e vinhos (MANACH *et al.*, 2004). Possuem uma estrutura química básica de três anéis aromáticos, anéis A, C e B, e são subdivididos em seis subclasses conforme o grau de oxidação do anel C: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanóis, antocianidinas e flavanonas (AHERNE e O'BRIEN, 2002). Dessa forma, diversos estudos vêm demonstrando os efeitos benéficos da suplementação com flavonoides em modelos de doenças do SNC, causando a redução do estresse oxidativo através da modulação de vias de sinalização celular, promovendo, assim, a neuroproteção (SPENCER, 2008; AGGARWAL *et al.*, 2010; HODKOVA *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; CHTOUROU *et al.*, 2015b; SACHDEVA e CHOPRA, 2015; WANG *et al.*, 2015; ADIL *et al.*, 2016b).



**Figura 1:** Estrutura química básica dos flavonoides. Imagem adaptada de BUSCH *et al.* (2015).

Dentre as subclasses de flavonoides, encontram-se as flavanonas, como a naringina, que vem sendo amplamente estudada nos últimos anos (ALAM *et al.*, 2014). Conhecida quimicamente como 4',5,7-trihidroxi-flavanona-7-ramnoglucósido, a naringina foi descoberta em 1857 e é encontrada predominantemente em frutas cítricas, como o limão, a laranja e a toranja (BHARTI *et al.*, 2014). A naringina possui duas moléculas de glicose ligadas ao anel aromático A, o que lhe confere maior solubilidade em água quando comparada a outros flavonoides (RANGASWAMI, 1939; BHARTI *et al.*, 2014).



**Figura 2:** Estrutura química da naringina. Imagem adaptada de ALAM *et al.* (2014).

Devido à sua estrutura glicosilada, a naringina pode ser absorvida de diferentes maneiras (KUMAR e PANDEY, 2013; LEWANDOWSKA *et al.*, 2013). Transportadores de glicose dependentes de sódio nos enterócitos podem realizar o transporte da naringina em sua forma glicosilada do lúmen intestinal (KUMAR e PANDEY, 2013). Além disso, glicosidases presentes tanto em bactérias da microbiota intestinal como na parede dos enterócitos, podem desglicosilar a naringina para sua forma aglicona, naringenina, que é absorvida através de difusão passiva (LEWANDOWSKA *et al.*, 2013). Assim, devido à

sua maior lipofilia, a naringenina apresenta maior capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (EL MOHSEN *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2014).

## **1.2. Oxigênio e metabolismo mitocondrial**

Estima-se que a atmosfera terrestre seja composta por aproximadamente 21% de oxigênio, presente predominantemente na forma diatômica ( $O_2$ ), no entanto, apesar de abundante em nosso meio ambiente, o  $O_2$  também exerce efeitos tóxicos sobre os seres vivos (HALLIWELL, 2007). Isso ocorre, basicamente, devido à estrutura química do  $O_2$ , que possui dois elétrons desemparelhados em sua camada de valência, tornando-o altamente reativo (HALLIWELL, 2007; HALLIWELL, 2009). Dessa forma, organismos constantemente expostos ao  $O_2$  desenvolveram mecanismos capazes de contrapor sua toxicidade, e até mesmo utilizá-lo em seu metabolismo, principalmente através da respiração celular, como acceptor final de elétrons no sistema de transporte de elétrons mitocondrial (STEM) (HALLIWELL, 2007).

O STEM, localizado na membrana mitocondrial interna, é composto por quatro enzimas diferentes, que recebem elétrons de substratos oxidáveis e utilizam a energia transferida por esse fluxo de elétrons para bombear prótons ( $H^+$ ) da matriz para o espaço intermembrana mitocondrial (LEHNINGER *et al.*, 2013). Assim, os principais fornecedores de elétrons para o STEM são as coenzimas nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido ( $NADH.H^+$ ) e flavina adenina dinucleotídeo reduzido ( $FADH_2$ ). Esses equivalentes redutores são provenientes da oxidação de intermediários no ciclo do ácido cítrico, os quais se originam do metabolismo de carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos e etanol (LIEBERMAN *et al.*, 2007; NELSON e COX, 2013).

Dessa forma, o STEM oxida coenzimas reduzidas enquanto transfere  $H^+$  através da membrana mitocondrial interna (NELSON e COX, 2013). A NADH-desidrogenase (Complexo I) recebe elétrons do  $NADH.H^+$ , ao passo que transfere quatro  $H^+$ , enquanto que o complexo II oxida succinato em fumarato, reduzindo o FAD em  $FADH_2$ . Após, ambas transferem os elétrons para a ubiquinona, reduzindo-a a ubiquinol. Em seguida, a ubiquinona:citocromo c-oxidoreductase (Complexo III) acopla a transferência de elétrons do ubiquinol para o citocromo c, transferindo simultaneamente quatro  $H^+$  para o espaço intermembranas. Já a citocromo-oxidase (Complexo IV) transfere os elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, reduzindo o mesmo a água, concomitantemente à transferência de 2  $H^+$  para o espaço intermembranas. Ao final, os prótons bombeados para o espaço intermembrana retornam passivamente a matriz mitocondrial através de um poro para prótons na enzima ATP-sintase, que utiliza a energia conservada pelo gradiente para síntese de adenosina trifosfato (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*) a partir de adenosina difosfato (ADP, do inglês *adenosine diphosphate*) e fosfato inorgânico (LIEBERMAN *et al.*, 2007; NELSON e COX, 2013). Estima-se que cerca de 80 a 95% do oxigênio captado pela célula seja consumido pelas mitocôndrias através da transferência de elétrons acoplada a síntese de ATP (HALLIWELL, 2007; DI MEO *et al.*, 2016). Devido a isso, as mitocôndrias exercem um importante papel regulador em diversos processos celulares, como apoptose, diferenciação celular e processos adaptativos, devido à sinalização com outros compartimentos celulares através das espécies reativas produzidas principalmente durante o fluxo de elétrons no STEM (HALLIWELL, 2006; NELSON e COX, 2013; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

### 1.3. Homeostase redox e estresse oxidativo

Há aproximadamente cinquenta anos, evidências demonstraram pela primeira vez a presença de radicais livres e enzimas antioxidantes em amostras biológicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Assim, nas décadas seguintes, com o aumento das pesquisas na área, foram descobertas inúmeras outras espécies reativas, criando um consenso de que essas espécies promoviam toxicidade celular através do dano a biomoléculas, e que sua eliminação promoveria a proteção e bom funcionamento celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). No entanto, atualmente, essa perspectiva não é mais aceita, pois evidências mais recentes demonstram que a célula constantemente produz espécies reativas devido ao seu importante papel fisiológico, principalmente na sinalização celular (DROGE, 2002; HALLIWELL, 2006; HALLIWELL, 2009). Portanto, a homeostase redox consiste no equilíbrio entre a formação de espécies reativas e a neutralização das mesmas, sendo que a manutenção desse estado basal é fundamental para a preservação das funções celulares (DROGE, 2002; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

As principais espécies reativas produzidas pelas células podem ser divididas em dois grupos, as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (KALYANARAMAN, 2013). As ERO incluem os radicais e não radicais derivados do  $O_2$ , como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $^{\bullet}OH$ ), já as ERN incluem principalmente o óxido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Tanto as ERO e ERN podem ser produzidas em diversos compartimentos celulares como o retículo endoplasmático, peroxissomos e mitocôndrias, ou então por exposição a agentes exógenos

como fármacos, cigarro e radiação ionizante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

Gerado a partir da captação de elétrons pelo  $O_2$ , o  $O_2^{\cdot-}$  é uma ERO impermeável às membranas e possui uma meia vida curta, de cerca de  $10^{-6}$ s (KALYANARAMAN, 2013; SCHWARZLANDER e FINKEMEIER, 2013). Além disso, o  $O_2^{\cdot-}$  é produzido por vários componentes celulares como as enzimas NADPH-oxidases (NOXs), xantina-oxidorreductase, citocromo P450 (CYP450), lipoxigenases e cicloxigenases devido à sua função sinalizadora, porém, as organelas responsáveis pela maior geração de  $O_2^{\cdot-}$  são as mitocôndrias, devido ao grande fluxo de elétrons entre os componentes do STEM; cerca de 1-3% dos elétrons transferidos pelo STEM escapam do sistema e são captados precocemente pelo  $O_2$  (CADENAS e DAVIES, 2000; BIRBEN *et al.*, 2012; ARTEAGA *et al.*, 2015; YE *et al.*, 2015). Estressores exógenos como a fumaça do cigarro e radiação ionizantes também induzem a formação de  $O_2^{\cdot-}$  na presença de oxigênio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

Ao contrário do  $O_2^{\cdot-}$ , o  $H_2O_2$  é permeável às membranas biológicas e possui uma meia vida longa, de aproximadamente  $10^{-5}$ s, devido a sua importante função como molécula sinalizadora e na defesa contra patógenos (GIORGIO *et al.*, 2007). A principal forma de geração do  $H_2O_2$  é a partir do  $O_2^{\cdot-}$  através da captação de dois  $H^+$  e um elétron, catalisada pela enzima superóxido-dismutase (SOD) (CHANCE *et al.*, 1979). No entanto, outras enzimas como a xantina-oxidase, monoamina-oxidase e urato-oxidase também produzem  $H_2O_2$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Contudo, apesar de o  $H_2O_2$  possuir baixa reatividade, o mesmo pode ser convertido a  $\cdot OH$  através da interação



com  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  pelas reações de Fenton e Haber-Weiss, respectivamente (YOUNG e WOODSIDE, 2001).

Apesar de não ser permeável às membranas, o  $\cdot\text{OH}$  é o radical livre mais danoso derivado do  $\text{O}_2$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Como mencionado anteriormente, as principais formas de geração de  $\cdot\text{OH}$  são através da reação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas reações de Fenton e Haber-Weiss, no entanto, o calor e a radiação ionizante também podem induzir a formação de  $\cdot\text{OH}$  a partir do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de  $\text{H}_2\text{O}$  (YOUNG e WOODSIDE, 2001; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Além disso, acredita-se que o  $\cdot\text{OH}$  não possua função sinalizadora, pois, além de sua meia vida ser curta, cerca de  $10^{-9}\text{s}$ , a alta reatividade do  $\cdot\text{OH}$  faz com que este prontamente reaja com as biomoléculas mais próximas, danificando carboidratos, lipídios, aminoácidos e ácidos nucleicos (GUTOWSKI e KOWALCZYK, 2013; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

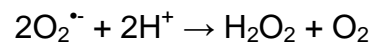
Considerado a mais importante ERN, o  $\text{NO}\cdot$  é um radical livre gasoso, possui alta permeabilidade às membranas biológicas e meia vida longa, de aproximadamente 2s (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). O  $\text{NO}\cdot$  é sintetizado a partir da arginina pelas enzimas óxido-nítrico-sintase (NOS), que compreendem três isoformas: endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzível (iNOS) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). O  $\text{NO}\cdot$  assume diferentes funções biológicas dependendo de qual enzima é responsável por sua síntese: neuromodulador quando sintetizado pela nNOS, regulador da vasodilatação quando oriundo eNOS e indutor de processo inflamatório quando gerado pela iNOS (LUNDBERG *et al.*, 2008). Além disso, a reação do  $\text{NO}\cdot$  com o  $\text{O}_2$  e o  $\text{O}_2^{\cdot-}$

em diferentes condições, pode levar a geração de inúmeras outras espécies reativas como o  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_2^\bullet$  e  $\text{ONOO}^-$  (THOMAS, 2015).

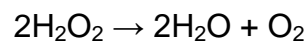
Derivado do  $\text{NO}^\bullet$ , o  $\text{ONOO}^-$  é um não radical que é permeável às membranas biológicas (RADI, 2013). A principal forma de geração do  $\text{ONOO}^-$  é através da reação espontânea e não enzimática do  $\text{NO}^\bullet$  com o  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , processo que é dependente da concentração de ambas as espécies reativas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Apesar de não possuir função fisiológica conhecida, o  $\text{ONOO}^-$  apresenta uma alta capacidade de reagir diretamente com biomoléculas, apesar de sua meia vida ser inferior a  $10^{-3}\text{s}$  (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Assim, componentes celulares localizados em compartimentos da célula onde ocorre a geração de  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  estão mais susceptíveis ao dano oxidativo desencadeado pelo  $\text{ONOO}^-$  (BECKMAN e KOPPENOL, 1996; RADI, 2013).

Ademais, para evitar o aumento excessivo nos níveis de ERO e ERN, a célula dispõe de sistemas capazes de eliminar essas espécies reativas, mantendo suas concentrações em níveis fisiológicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Esses sistemas podem ser separados em sistema antioxidante enzimático e sistema antioxidante não enzimático. O primeiro é formado pelas enzimas antioxidantes, como a SOD, catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPx), glutarredoxinas (Grx), tioredoxina-redutase (TrxR) e glioxalase 1 (GLO1) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Já o sistema não enzimático tem como o principal componente a glutathione reduzida (GSH), além de outros compostos como vitaminas, carotenoides, ácidos graxos poli-insaturados e polifenóis (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

A SOD (EC 1.15.1.1) tem como principal função regular a concentração do  $O_2^{\cdot-}$ , e possui três isoformas distribuídas em diferentes compartimentos subcelulares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). A MnSOD, dependente de manganês, é encontrada predominantemente nas mitocôndrias. Já a CuZnSOD, dependente de cobre e zinco, é encontrada no meio extracelular, citoplasma, lisossomos, peroxissomos e núcleo. Já a EcSOD, é similar a CuZnSOD, também dependente de cobre e zinco para sua atividade. Dessa forma, as SOD são a primeira linha de defesa contra a toxicidade do  $O_2^{\cdot-}$ , evitando também a formação do  $ONOO^-$  (MISRA e FRIDOVICH, 1972; FRIDOVICH, 1995; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Todas as isoformas da SOD catalisam a seguinte reação:

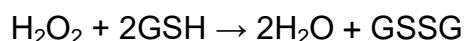


Assim, o  $H_2O_2$  gerado a partir do  $O_2^{\cdot-}$  pela ação da SOD precisa ser eliminado, função que é executada pelas enzimas CAT e GPx em diferentes localizações subcelulares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). A CAT (EC 1.11.1.6) é encontrada predominantemente nos peroxissomos, sendo, portanto, a principal enzima responsável pela eliminação do  $H_2O_2$  nessas organelas, convertendo o mesmo a  $H_2O$  e  $O_2$  numa reação dependendo de ferro, como exemplificado a seguir (KODYDKOVA *et al.*, 2014; SIES, 2014):



Ao contrário da CAT, a GPx (EC 1.11.1.9) elimina o  $H_2O_2$  em outras regiões da célula (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Atualmente são conhecidas oito isoformas da GPx distribuídas em diferentes regiões intra e extracelulares, como no citosol, mitocôndrias, membranas, meio extracelular e plasma

(BRIGELIUS-FLOHE e MAIORINO, 2013). Além disso, a GPx é uma seleno-enzima, e possui uma alta afinidade pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podendo regular a disponibilidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mesmo quando presente em baixas concentrações, no entanto, a GPx também pode atuar sobre hidroperóxidos orgânicos e ONOO<sup>-</sup>, numa reação dependente de GSH, descrita a seguir (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015):



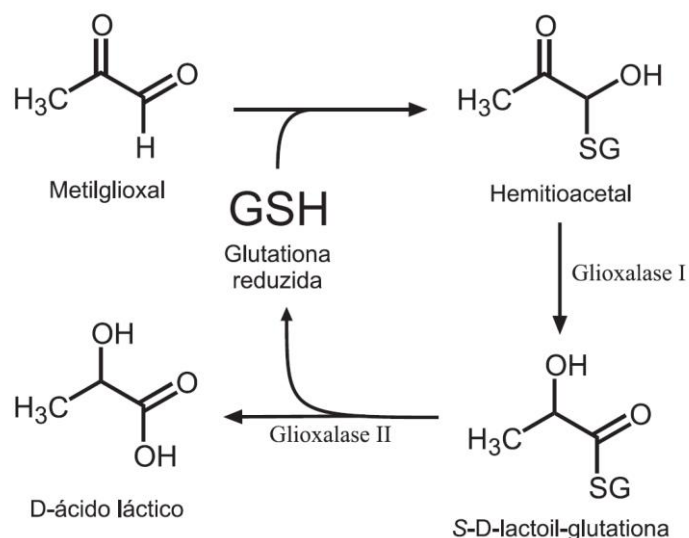
Outras proteínas dependentes de GSH para sua atividade são as Grx (EC 1.20.4.1), porém, ao contrário da CAT e GPx, as Grx não atuam sobre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Quatro isoformas das Grx foram documentadas, sendo estas amplamente distribuídas no citosol, mitocôndrias e inclusive no núcleo (LU e HOLMGREN, 2014). Apesar de não agirem diretamente sobre espécies reativas, as Grx são de fundamental importância na homeostase redox celular devido a sua capacidade de reduzir grupos tióis oxidados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Dessa forma as Grx podem restaurar a atividade de enzimas, como a GPx, e outras proteínas oxidadas através da seguinte reação:



Além das Grx, outras proteínas também são responsáveis pela redução de grupos tióis oxidados. Dentre essas proteínas encontra-se a TrxR (EC 1.8.4.8), uma seleno-enzima que faz parte do sistema das tioredoxinas, juntamente com a Grx (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Atualmente, três isoformas da TrxR foram identificadas: TrxR-1 citosólica, TrxR-2 mitocondrial e TrxR-3 predominante em células germinativas (HOLMGREN e BJORNSTEDT, 1995;

LU e HOLMGREN, 2014). No entanto, apesar de ter ação semelhante a Grx, as TrxR são dependentes de NADPH ao invés de GSH, e agem principalmente em outras enzimas do sistema das tiorredoxinas, como a tiorredoxina (Trx) e peroxirredoxina (Prx) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

A GLO1 (EC) faz parte do sistema das glioxalases, em conjunto com a GLO2 (ALLAMAN *et al.*, 2015). Ao contrário das enzimas citadas anteriormente, a GLO1 não atua sobre uma espécie reativa ou proteínas oxidadas, mas sim sobre o hemitioacetal, um composto que é formado através da reação espontânea da GSH com o metilglioxal (MG), um subproduto da glicólise, que é formado a partir da fragmentação do gliceraldeído-3-fosfato e da dihidroxiacetona (SOUSA SILVA *et al.*, 2013; ALLAMAN *et al.*, 2015). Estima-se que cerca de 0,1 a 0,4% do fluxo da via glicolítica seja convertido a MG, no entanto, essa estimativa pode ser maior, visto que o MG é altamente reativo com lipídios, ácidos nucleicos e resíduos de lisina e arginina em proteínas, dando origem a produtos de glicação avançada (AGE, do inglês *advanced glycation end-products*), que induzem processo inflamatório e estresse oxidativo através da interação com os receptores de AGE (THORNALLEY, 1990; DISTLER e PALMER, 2012; SOUSA SILVA *et al.*, 2013). Dessa forma, o sistema das glioxalases age evitando o acúmulo de MG e os danos causados devido a glicação de biomoléculas, além de restaurar a GSH consumida durante a formação do hemitioacetal, como exemplificado na figura 1, a seguir:



**Figura 3:** Sistema das glioalases. Imagem de DUTRA (2005).

Conhecida como o principal antioxidante não enzimático e tampão redox da célula, a GSH pode reagir diretamente com algumas espécies reativas ou ser utilizada por diversas enzimas antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). A GSH é um tripeptídeo formado por glutamato, cisteína e glicina, e é sintetizada no citoplasma das células pelas enzimas  $\gamma$ -glutamilcisteína-ligase e glutationa-sintetase (AOYAMA e NAKAKI, 2013; AOYAMA e NAKAKI, 2015). Dessa forma, a GSH é considerada uma das primeiras defesas da célula contra uma elevação nos níveis de espécies reativas, pois pode reagir diretamente com  $\cdot\text{OH}$  e  $\text{ONOO}^-$ , além de ser utilizada como doador de elétrons pelas enzimas GPx e Grx (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Assim, depois de oxidada a GSSG, a GSH pode ser reduzida novamente através da ação da enzima glutationa-redutase, que utiliza  $\text{NADPH.H}^+$  como força redutora (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Ademais, além da GSH, as vitaminas E, C, bem como os ácidos graxos poliinsaturados também compõem o sistema de defesa antioxidante não enzimático (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

Dessa forma, quando ocorre um desequilíbrio na homeostase redox celular, instala-se um estado de estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Esse estado é basicamente o aumento das espécies reativas a níveis além da capacidade da célula de eliminá-las, o que pode ocorrer de diversas maneiras, como: (1) uma disfunção do sistema antioxidante não enzimático, (2) disfunção do sistema antioxidante enzimático e/ou (3) produção excessiva de espécies reativas, que, conseqüentemente reagem com proteínas, lipídios e DNA, levando a oxidação dessas biomoléculas (SIES, 1997; DROGE, 2002; HALLIWELL, 2006; BIRBEN *et al.*, 2012). No entanto, quando a elevação dos níveis de espécies reativas ocorre de forma moderada, a célula pode adaptar-se a esse aumento, através da indução da ativação de fatores de transcrição que irão induzir, então, a síntese de enzimas e moléculas antioxidantes (PACKER e CADENAS, 2007; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; OLSEN *et al.*, 2015).

No entanto, algumas células ou tecidos são mais susceptíveis ao desequilíbrio da homeostase redox, como o SNC. Isso ocorre porque o mesmo possui um metabolismo muito ativo, levando assim a um alto consumo de oxigênio, que pode levar a geração de  $O_2^{\cdot-}$  (WANG e MICHAELIS, 2010). Além disso, o SNC também possui alto conteúdo de ferro, o que pode favorecer a geração de  $\cdot OH$ , alto conteúdo de lipídios, baixa produção de antioxidantes enzimáticos e baixa capacidade de regeneração celular. De fato, diversas doenças crônicas do SNC apresentam disfunção da homeostase redox como uma característica, embora não se saiba ao certo se essa disfunção é a causa ou a consequência de determinada doença (LOSADA-BARREIRO e BRAVO-DIAZ, 2017). Dessa maneira, pesquisas vêm buscando diversas alternativas

para reduzir o estresse oxidativo presente nas doenças do SNC, buscando, assim, restaurar a homeostase redox e reestabelecendo a função cognitiva (SPENCER, 2008).

#### **1.4. Memória**

Segundo as palavras de IZQUIERDO (2011), a memória é a capacidade do cérebro e dos outros sistemas para adquirir, guardar e lembrar informações, transformando, assim, o que aprendemos através de nossas experiências em informação que é armazenada em forma de modificações celulares em nosso cérebro. No entanto, existem diversos tipos de memória que são classificadas de acordo com seu conteúdo, como a memória declarativa e a memória não declarativa, de acordo com o tempo de sua duração, como as memórias de longa duração e de curta duração, ou então de acordo com sua função, como a memória de trabalho (IZQUIERDO, 2011). Além disso, regiões encefálicas como o córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado e cerebelo possuem papéis distintos na aquisição e armazenamento dos diferentes tipos de memória.

Em humanos, o córtex pré-frontal é a região responsável pela memória de trabalho, e está localizado na parte anterior do lobo frontal, representando quase 25% do total da área cortical frontal (KREBS, 2013). É dividido funcionalmente em duas regiões diferentes, denominadas córtex pré-frontal dorsolateral e córtex pré-frontal orbitofrontal, que possuem conexões neurais com várias outras estruturas cerebrais, como o hipocampo, a amígdala, o cerebelo, o corpo estriado e outras áreas corticais (KANDEL, 2013). A vasta rede neural em que o córtex pré-frontal está envolvido auxilia sua função como



uma área associativa do cérebro, integrando informações armazenadas em outras regiões cerebrais, assim, demonstrando a importância do córtex pré-frontal para gerenciar as informações adquiridas, bem como coordenar o planejamento, comportamento e a adaptabilidade em diferentes ambientes sociais (SQUIRE e KANDEL, 2009; IZQUIERDO, 2011).

Localizada no lobo temporal, o hipocampo pertence ao sistema límbico e tem um papel decisivo nos processos de aprendizagem e formação das memórias (KREBS, 2013). Está estruturalmente dividido em três partes: subínculo, hipocampo e giro dentado (MACHADO, 2014). Além disso, o hipocampo possui conexões, através do córtex entorrinal, com diversas estruturas cerebrais, como áreas neocorticais, hipotálamo, amígdala e núcleo accumbens (KREBS, 2013). Assim, o hipocampo é uma estrutura cerebral central nos mecanismos de formação de memória: a aquisição, consolidação e evocação, de ambas as memórias de curto e longo prazo (SQUIRE e KANDEL, 2009; IZQUIERDO, 2011).

Já o corpo estriado é o maior componente de um grupo de sete estruturas subcorticais chamadas núcleos da base (KREBS, 2013). Putamen, núcleo caudado e núcleo accumbens compreendem o corpo estriado, que possui várias conexões com diferentes estruturas cerebrais, como o hipocampo, a amígdala, o tálamo e as áreas corticais (KREBS, 2013). Assim, ao longo dessas conexões, o corpo estriado é capaz, juntamente com outras estruturas dos núcleos da base, de estabelecer diversos circuitos que lhe permitam transmitir estímulos motores, associativos e límbicos, regulando, assim, as funções associadas a esses circuitos (KREBS, 2013; MACHADO, 2014).

O cerebelo está localizado na fosse craniana posterior, sendo responsável pela coordenação, previsão e aprendizagem motora (MACHADO, 2014). O mesmo é anatomicamente dividido em dois hemisférios: direito e esquerdo, separados por uma estrutura denominada vermis (KREBS, 2013). O cerebelo possui conexões com regiões cerebrais distintas, como áreas corticais motoras, o tálamo, e recentemente tem sido abordado seu papel nas funções cognitivas através de conexões com a área pré-frontal do córtex (KREBS, 2013; MACHADO, 2014). No entanto, as funções mais conhecidas do cerebelo são as que envolvem o aprendizado motor e o controle de movimentos voluntários, integrando estímulos da periferia e do córtex motor (KREBS, 2013).

### **1.5. Programação metabólica fetal e consumo de polifenóis durante a gestação**

A hipótese de que intervenções durante a gestação poderiam modular o desenvolvimento fetal foi descrita há mais de 20 anos, por HALES e BARKER (1992). Nesse trabalho, os autores identificaram uma correlação entre o baixo peso que bebês apresentavam ao nascer com o desenvolvimento de complicações na vida adulta, como síndrome metabólica, diabetes *mellitus* tipo II e doenças cardiovasculares. No entanto atualmente já se sabe que uma série de outros fatores como a obesidade materna, prática de exercícios físicos e qualidade da dieta materna também podem promover adaptações fetais durante a vida uterina (MARCELINO *et al.*, 2013; CAROLAN-OLAH *et al.*, 2015).

Dessa forma, apesar das evidências demonstrando os efeitos benéficos do uso de polifenóis e flavonoides como moduladores da homeostase redox,

pouco se sabe ainda sobre os efeitos do seu consumo durante a gravidez na prole. Pesquisas recentes utilizando modelos animais demonstram resultados controversos sobre os efeitos do consumo materno de polifenóis durante a gestação em diferentes tecidos fetais (VANHEES *et al.*, 2011; VANHEES *et al.*, 2013; BALAN *et al.*, 2017; MEENA *et al.*, 2017). Já estudos em humanos, demonstram que o consumo de alimentos ricos em polifenóis, principalmente durante o terceiro trimestre da gestação, é prejudicial ao fechamento do *ductus arteriosus* fetal, levando a problemas cardiorrespiratórios (ZIELINSKY *et al.*, 2010; ZIELINSKY e BUSATO, 2013; ZIELINSKY *et al.*, 2013; ZIELINSKY *et al.*, 2014). Sendo assim, fica evidente a necessidade de mais estudos que busquem elucidar os efeitos do consumo materno de polifenóis e flavonoides durante a gestação sobre a saúde fetal, especialmente no SNC.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar o efeito da suplementação com naringina durante a gestação sobre a homeostase redox, o metabolismo energético cerebral, parâmetros de neurodesenvolvimento e de memória em filhotes de ratas Wistar.

### **2.2. Objetivos específicos**

Determinar parâmetros de homeostase redox em cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de filhotes fêmeas de mães submetidas à suplementação com naringina durante a gestação. Os parâmetros avaliados foram: (a) a produção de espécies reativas (DCFH-DA); (b) níveis de  $O_2^{\cdot -}$  e  $NO^{\cdot}$  mitocondrial; (c) a concentração de glutathiona reduzida (GSH); e (d) a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, Grx, TrxR e GLO1.

Verificar a funcionalidade mitocondrial em cerebelo, hipocampo, córtex pré-frontal e estriado de filhotes fêmeas cujas mães foram submetidas à suplementação com naringina durante a gestação por citometria de fluxo através da massa e do potencial de membrana mitocondrial utilizando-se as sondas MitoTracker<sup>®</sup> Red CM-H2XRos e MitoTracker<sup>®</sup> Green FM.

Avaliar parâmetros gestacionais nas mães submetidas à suplementação com naringina durante a gestação. Os parâmetros gestacionais verificados foram a avaliação do peso das ratas prenhas e tempo de gestação. Também foram avaliados o número de filhotes nascidos, viabilidade dos filhotes (índice de viabilidade), e o número de filhotes machos/fêmeas.

Avaliar parâmetros de desenvolvimento na prole submetida à suplementação pré-natal com naringina. Observamos o dia da abertura dos olhos, dia da abertura do ouvido externo, dia em que o corpo dos filhotes ficou completamente coberto por pelos. Ainda foram realizados os testes de endireitamento de superfície, geotaxia negativa, aversão à queda e força dos membros posteriores.

Também foram avaliados parâmetros comportamentais em mães submetidas à suplementação com naringina durante a gestação, bem como nos filhotes machos nos testes de campo aberto e reconhecimento de objeto.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Capítulo I**

Neste capítulo serão apresentados resultados relacionados à avaliação das ratas prenhas e do desenvolvimento da prole. Nesta parte do trabalho avaliamos os parâmetros reprodutivos das ratas prenhas, além de parâmetros de desenvolvimento de algumas características físicas da prole, seu desenvolvimento neuromotor nas duas primeiras semanas após o nascimento e também seu desempenho em testes comportamentais que avaliaram a função mnemônica ao final da terceira semana após o nascimento. Apesar do conjunto dos dados apresentados aqui não terem sido suficientes para a elaboração de um artigo científico, pudemos através desses resultados demonstrar que o nosso modelo de suplementação materna com naringina durante a gestação não levou a alterações significativas no desenvolvimento das características físicas, neuromotoras e comportamentais dos filhotes machos nas idades em que avaliamos em nosso protocolo experimental.

Autores: Bernardo Gindri dos Santos, Régis Mateus Hözer, Mariana Scortegagna Crestani, Caroline Peres Klein e Cristiane Matté.

### **3.1.1. Materiais e Métodos**

#### *3.1.1.1. Aspectos Éticos*

Todos os experimentos com os animais foram conduzidos seguindo os cuidados preconizados pelas diretrizes governamentais oficiais conforme a lei nº 11.794/2008 e as diretrizes do CONCEA, em relação à experimentação animal (Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA) e eutanásia (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA), indicadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), bem como normativas internacionais como o “Guide for Care and Use of Laboratory Animals” (publicação do NIH Nº 80-23, revisado em 1996) e as normas do Canadian Council on Animal Care (CCAC). Esse projeto foi submetido à avaliação da Comissão de Pesquisa do Instituto de Ciências Básicas da Saúde/UFRGS (COMPESQ/ICBS/UFRGS) e da CEUA/UFRGS, e aprovado sob o número de protocolo 31397.

#### *3.1.1.2. Animais*

Para a execução desse projeto de pesquisa foram utilizadas ratas Wistar fêmeas prenhas provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica da UFRGS – Porto Alegre/Brasil e foram mantidas em ciclos claro-escuro de 12h/12h, à temperatura constante de 22°C + 1°C com acesso a alimento e à água *ad libitum*. A prole foi mantida com a mãe em caixa individual (41 x 34 x 16 cm) até o dia pós-natal 21 (DPN21). Após o desmame, os filhotes foram mantidos em caixas separadas de suas mães, com no máximo quatro filhotes por caixa.

### 3.1.1.3. *Protocolo Experimental*

Confirmada a prenhez, cada grupo iniciou com a suplementação de seu respectivo tratamento. O grupo controle recebeu água destilada via gavagem (5 mL/Kg), enquanto o grupo naringina recebeu o flavonoide na concentração de 100 mg/kg dissolvido em água (5 mL/Kg), também via gavagem (AGGARWAL *et al.*, 2010). A suplementação foi realizada desde o primeiro até o último dia de gestação. O dia correspondente ao nascimento da prole foi definido como dia pós-natal zero (DPN0).

No DPN1 a ninhada foi pesada e um filhote macho de cada ninhada foi escolhido aleatoriamente para realizar os testes comportamentais de avaliação do desenvolvimento neuromotor. Os testes realizados foram o de endireitamento de superfície, geotaxia negativa, aversão à queda e de suspensão utilizando os membros posteriores. Além disso, os parâmetros de desenvolvimento das características físicas foram avaliados em outro filhote macho da ninhada. As características físicas avaliadas foram o dia em que ocorreu a abertura dos olhos, dia da abertura dos ouvidos e o dia em que o corpo dos filhotes ficou completamente coberto por pelos. Já no DPN21, os filhotes foram desmamados e ambos os filhotes machos e as mães foram submetidos aos testes comportamentais do campo aberto seguido do reconhecimento de objetos. Após a realização dos testes comportamentais, os filhotes machos e as mães foram eutanasiados.

### 3.1.1.4. *Avaliação dos Parâmetros Reprodutivos*

As avaliações reprodutivas foram avaliadas conforme MARCELINO *et al.* (2013). Os resultados foram calculados da seguinte maneira: Índice de sucesso



da prenhez [(nº de ratas diagnosticadas como prenhas/nº de ratas que pariram)], nº de filhotes nascidos por ninhada [(nº total de filhotes nascidos/nº de ratas prenhas que pariram)], % filhotes machos [(nº total de filhotes machos/nº total de filhotes machos e fêmeas)], índice de viabilidade dos filhotes no DPN1 [(nº total de filhotes vivos/nº total de filhotes nascidos)].

#### 3.1.1.5. *Avaliação das Características Físicas e Anatômicas*

A avaliação do aparecimento dos dentes incisivos, abertura dos olhos, abertura dos ouvidos, dia da cobertura completa por pelos e o peso dos filhotes foram realizadas conforme CALVINO-NUNEZ e DOMINGUEZ-DEL-TORO (2014).

#### 3.1.1.6. *Avaliação do Desenvolvimento Neuromotor*

##### 3.1.1.6.1. Endireitamento de Superfície

Esse teste consiste em colocar o animal em decúbito dorsal em uma superfície recoberta com poliestireno e então avaliar quanto tempo, em segundos, o filhote leva para se posicionar com os quatro membros totalmente em contato com a superfície de trabalho novamente (decúbito ventral). O primeiro dia em que o animal conseguir realizar o teste foi documentado. O tempo de resposta máximo será de 30s, sendo que um animal não reativo após esse tempo teve seu tempo de resposta como 30s (CHEN *et al.*, 2012).

##### 3.1.1.6.2. Geotaxia Negativa

A geotaxia negativa foi avaliada colocando-se o animal em posição de descida em uma superfície inclinada a 30° e recoberta com poliestireno. Dessa forma foi avaliado o primeiro dia que o filhote conseguiu dar uma volta de 180°,

posicionando-se em posição de subida na superfície inclinada. O primeiro dia em que o animal conseguiu realizar o teste foi documentado. O tempo de resposta máximo foi de 30s. Um animal não reativo teve pontuação de 30s (CHEN *et al.*, 2012).

#### 3.1.1.6.3. Aversão à Queda

A aversão à queda consiste em avaliar quanto tempo o animal demora a se esquivar quando colocado frente a um local elevado. Assim, o filhote foi colocado com a cabeça e patas dianteiras na beirada de uma superfície de trabalho recoberta com poliestireno a uma altura de 45 cm. A capacidade do filhote de esquivar-se e distanciar-se da posição em que fora colocado foi avaliada. O primeiro dia em que o animal conseguiu realizar o teste foi observado. O tempo de resposta máximo foi de 30 s. Um animal não reativo teve pontuação de 30s (CALVINO-NUNEZ e DOMINGUEZ-DEL-TORO, 2014).

#### 3.1.1.6.4. Teste de Suspensão em Barra

O teste de segurar-se em barra suspensa consiste em colocar o filhote em contato com suas patas dianteiras em uma barra de forma cilíndrica de 1 cm de diâmetro a uma altura de 30 cm da superfície de trabalho. O tempo em que cada filhote conseguiu ficar suspenso foi avaliado em segundos e avaliado diariamente do PN10 ao PN15. O tempo de resposta máximo foi de 30 s (TAMASHIRO *et al.*, 2000).

### 3.1.1.7. Testes Comportamentais

#### 3.1.1.7.1. Teste do Campo Aberto

O teste de campo aberto foi utilizado para avaliar o comportamento exploratório, locomotor e a memória de habituação dos ratos (NETTO *et al.*, 1986). O aparato consiste em uma arena de madeira de cor preta em formato de círculo (90 cm de diâmetro x 60 cm de profundidade), dividida virtualmente em 12 quadrantes. Os parâmetros analisados foram: número total de vezes que o animal cruzou as linhas pretas (crossings), distância total percorrida e velocidade média. Os animais foram filmados e os dados foram quantificados utilizando o software Any Maze (Stoelting, Wood Dale, IL). Cada animal foi avaliado por um período de 5 min no aparato.

#### 3.1.1.7.2. Teste do Reconhecimento de Objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi utilizado para avaliar o aprendizado e a memória de longa duração, baseando-se na tendência que os animais têm em interagir mais com novos objetos do que com objetos que já lhes são familiares (ENNACEUR e DELACOUR, 1988; ZOU e CREWS, 2006). O teste de reconhecimento de objetos foi realizado no mesmo aparato do teste de campo aberto e iniciou 24 horas após o teste de campo aberto. Para o teste de reconhecimento de objetos foram realizadas duas sessões: 1 sessão de treino e 1 sessão de teste. Na sessão de treino, os animais foram colocados na arena contendo dois objetos idênticos ( $A^1$  e  $A^2$ ) para livre exploração durante 5 minutos. 24h após o início da sessão de treino foi realizada a sessão de teste, também por cinco minutos, no entanto, nessa etapa, o objeto  $A^2$  foi substituído por um objeto B. Para ambos os testes, o parâmetro analisado foi o tempo

gasto na exploração de cada objeto (em segundos) durante 5 minutos, onde o tempo de exploração de cada objeto será aplicado em uma fórmula:  $[(\text{tempo explorando objeto B})/(\text{tempo explorando objetos A}^1 + \text{B}) * 100]$ , gerando o índice de discriminação do objeto B. Os testes foram gravados e os dados analisados com auxílio do software Any Maze (Stoelting, Wood Dale, IL).

#### 3.1.1.8. Análise Estatística

Os resultados foram analisados pelo teste  $t$  de Student (dados paramétricos) ou Mann-Whitney (dados não paramétricos). Os dados foram avaliados pelo programa GraphPad Prism 6.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas se  $p < 0,05$ .

### **3.1.2. Resultados**

#### 3.1.2.1. Parâmetros Reprodutivos

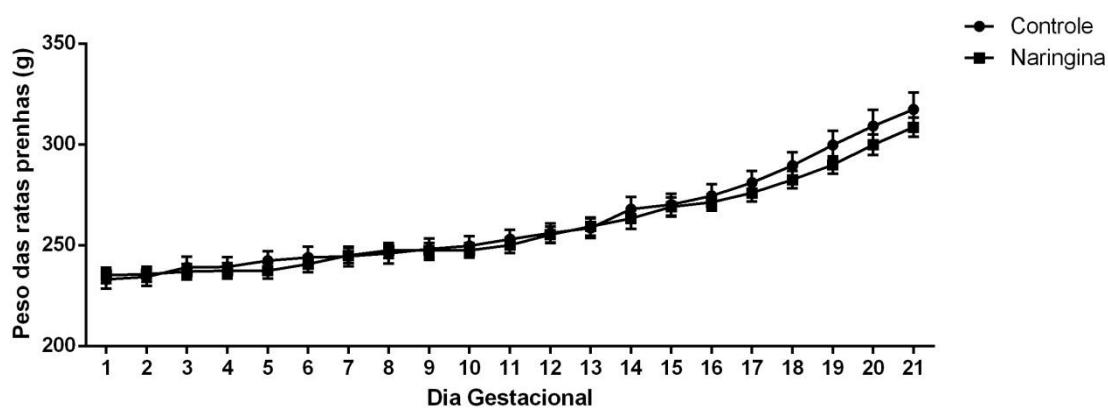
Não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa nos parâmetros reprodutivos que avaliamos entre ratas controle e ratas que receberam o tratamento com naringina durante a prenhez (Tabela 1).

**Tabela 1:** Dados reprodutivos de ratas prenhas controle e tratadas com naringina.

Parâmetros	Controle	Naringina	Valor de p
	(Média ± EPM)	(Média ± EPM)	
Nº de ratas prenhas	30	30	n/a
Duração da gestação (dias)	21,67 ± 0,09	21,50 ± 0,16	0,3688
Índice de sucesso da prenhez (%)	77,80 ± 5,08	72,00 ± 4,70	0,4261
Nº de filhotes nascidos por ninhada	9,45 ± 0,60	8,60 ± 0,62	0,3559
% filhotes machos	0,52 ± 0,03	0,48 ± 0,02	0,3302
Índice de viabilidade dos filhotes no DPN1	98,75 ± 0,62	99,50 ± 0,28	0,3202
Peso da ninhada (g) no DPN1	66,14 ± 3,67	60,71 ± 3,94	0,3325

A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student. Resultados expressos em média ± erro padrão da média (EPM).

Além disso, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no ganho de peso das ratas prenhas, tanto controle quanto naringina, no decorrer da prenhez (Figura 1).



**Figura 1:** Análise do ganho de peso das ratas prenhas de ambos os grupos ao longo da gestação (21 dias). A análise foi realizada através de múltiplos testes *t*

de Student.  $p > 0,05$  ( $n=14$ ). Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

### 3.1.2.2. Características Físicas e Anatômicas

Assim como nos parâmetros reprodutivos, não observamos nenhuma diferença estatisticamente relevante nas características físicas e anatômicas entre filhotes nascidos de ratas controle e filhotes nascidos de ratas que foram tratadas com naringina durante a prenhez (Tabela 2).

**Tabela 2:** Desenvolvimento das características físicas da prole.

<b>Parâmetros (dias)</b>	<b>Controle (Média <math>\pm</math> EPM)</b>	<b>Naringina (Média <math>\pm</math> EPM)</b>	<b>Valor de p</b>
Aparecimento dos dentes incisivos	9,940 $\pm$ 0,18	10,00 $\pm$ 0,20	0,8304
Abertura dos olhos	13,88 $\pm$ 0,16	14,38 $\pm$ 0,27	0,1291
Abertura dos ouvidos	13,53 $\pm$ 0,15	13,69 $\pm$ 0,17	0,4994
Cobertura completa por pelos	14,53 $\pm$ 0,12	14,69 $\pm$ 0,15	0,4227

A análise estatística foi realizada pelo teste  $t$  de Student ( $n=16-17$  animais). Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

### 3.1.2.3. Avaliação do Desenvolvimento Neuromotor

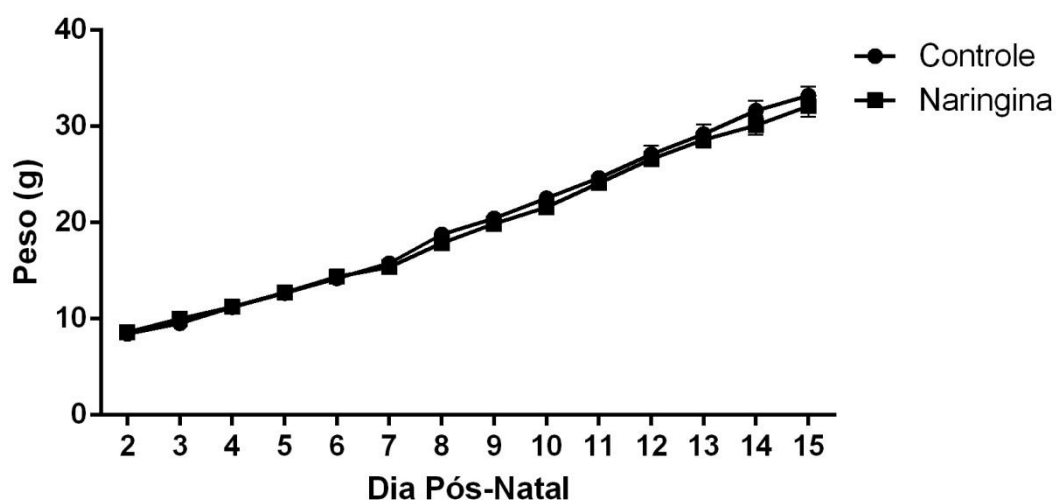
Não foi observado nenhum resultado estatisticamente significativo em relação ao dia em que os filhotes nascidos de mães controle e filhotes nascidos de mães tratadas com naringina começaram a manifestar os comportamentos avaliados (Tabela 3).

**Tabela 3:** Primeiro dia em que os filhotes manifestaram os comportamentos de Endireitamento de Superfície, Geotaxia Negativa, e Aversão à Queda.

Parâmetros (dias)	Controle	Naringina	Valor de p
	(Média ± EPM)	(Média ± EPM)	
Endireitamento de Superfície	2,06 ± 0,06	2,25 ± 0,11	0,1339
Geotaxia Negativa	5,81 ± 0,18	5,25 ± 0,39	0,2060
Aversão à Queda	3,06 ± 0,23	3,19 ± 0,22	0,6969

A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student (n=16-17 animais). Resultados expressos em média ± erro padrão da média (EPM).

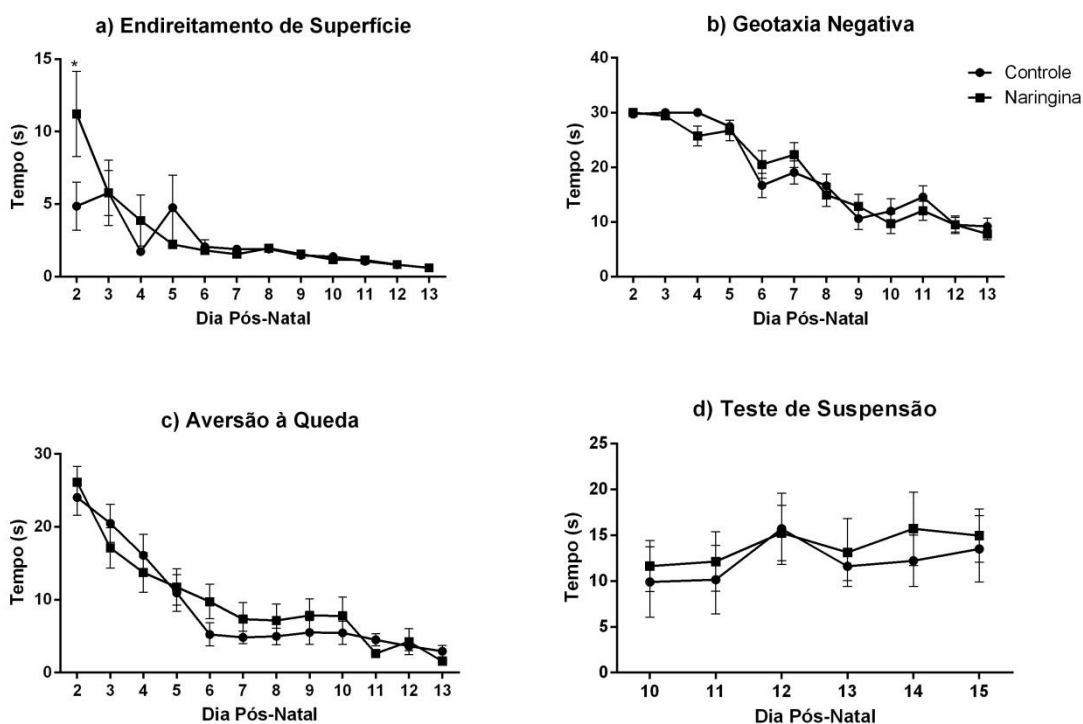
Também não observamos diferenças significativas no peso dos filhotes utilizados para a realização dos testes de neurodesenvolvimento entre os DPN2 e DPN15 (Figura 2).



**Figura 2:** Análise do ganho de peso dos filhotes machos utilizados para a realização dos testes de neurodesenvolvimento durante as duas primeiras semanas após o nascimento. A análise foi realizada através de múltiplos testes *t* de Student.  $p > 0,05$  (n=9-10). Resultados apresentados como média ± erro padrão da média.

Além disso, também não observamos diferenças significativas entre filhotes controle e filhotes naringina em relação aos testes de Geotaxia

Negativa [ $F(11,341)=1,080$ ;  $p=0,3766$ ], Aversão à Queda [ $F(11,341)=0,7303$ ;  $p=0,7094$ ] e de Suspensão [ $F(5,75) 0,08826$ ;  $p=0,9939$ ], no entanto, no teste de Endireitamento de Superfície, observamos uma diferença significativa no DPN2 [ $F(11,341)= 2,001$ ;  $p=0,0275$ ] (Figura 3).

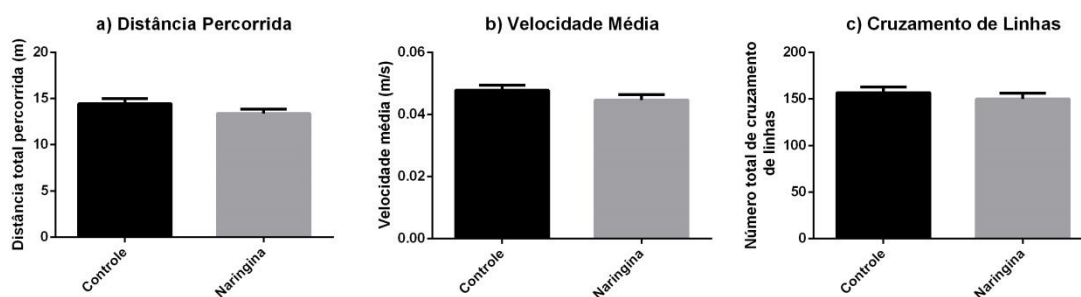


**Figure 3:** Análise do desempenho de filhotes nascidos de ratas controles e de filhotes nascidos de ratas suplementadas com naringina durante a gestação nos testes de (a) Endireitamento de Superfície, (b) Geotaxia Negativa, (c) Aversão à Queda e (d) Teste de Suspensão. A análise foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido do teste de Tukey,  $p>0,05$  ( $n=16-18$ ). Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.



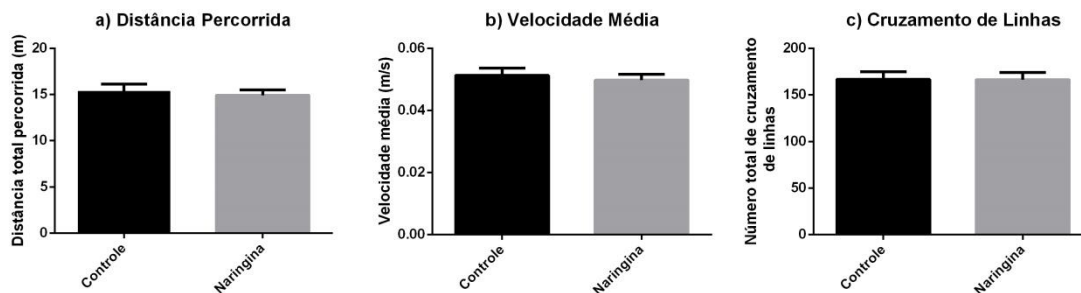
### 3.1.2.4. Testes Comportamentais

Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros avaliados [distância percorrida:  $t(33)=1,506$ ;  $p=0,1415$ ; velocidade média:  $t(33)=1,308$ ;  $p=0,1998$ ; cruzamento de linhas:  $t(33)=0,7538$ ;  $p=0,4563$ ] no teste do campo aberto quando comparado o desempenho de filhotes nascidos de mães controles ou filhotes nascidos de mães suplementadas com naringina (Figura 4).



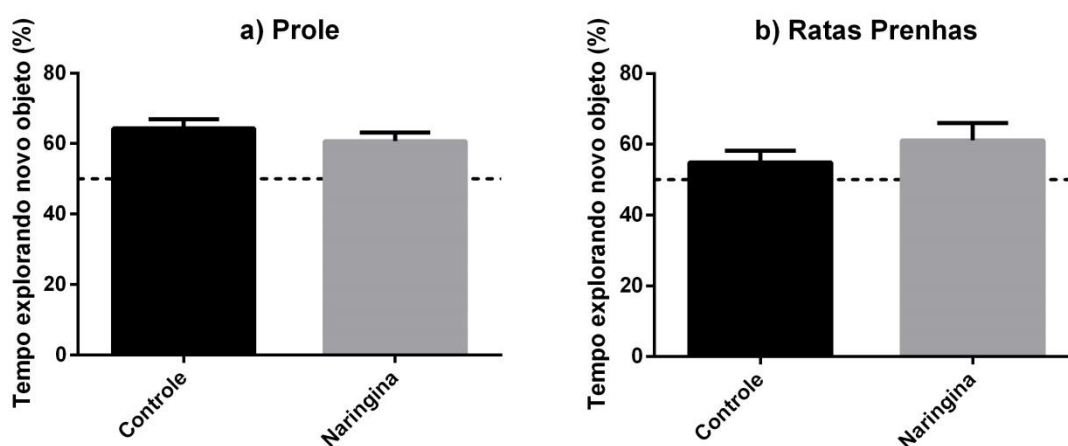
**Figura 4:** Resultados do desempenho de filhotes nascidos de ratas controle e ratas suplementadas com naringina no teste do campo aberto. Os parâmetros avaliados foram (a) distância percorrida, (b) velocidade média e (c) número de cruzamento de linhas. A análise foi realizada através do teste  $t$  de Student.  $p>0,05$  ( $n=16-19$ ). Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Além disso, também não observamos diferenças significativas quando avaliamos as ratas prenhas no mesmo teste [distância percorrida:  $t(21)=0,4606$ ;  $p=0,6498$ ; velocidade média:  $t(21)=0,4660$ ;  $p=0,6460$ ; cruzamento de linhas:  $t(21)=0,0162$ ;  $p=0,9872$ ] (Figura 5).



**Figura 5:** Resultados do desempenho das ratas prenhas controle e suplementadas com naringina no teste do campo aberto. Os parâmetros avaliados foram (a) distância percorrida, (b) velocidade média e (c) cruzamento de linhas. A análise foi realizada através do teste *t* de Student.  $p > 0,05$  ( $n = 10-15$ ). Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

Quanto ao teste de reconhecimento de objetos, também não observamos nenhuma diferença estatisticamente relevante quando avaliados os filhotes e mães de ambos os grupos [prole:  $t(24) = 1,017$ ;  $p = 0,3194$ ; ratas mães:  $t(22) = 1,092$ ;  $p = 0,2866$ ] (Figura 6).



**Figura 6:** Resultados do tempo explorando o novo objeto no teste de reconhecimento de objetos tanto para (a) prole como para as (b) ratas prenha,

mães dos filhotes. A linha pontilhada marca o limiar de exploração de 50%. A análise foi realizada através do teste *t* de Student.  $p > 0,05$  ( $n=10-19$ ). Resultados apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

### **3.1.3. Discussão**

Atualmente, diversos estudos vêm demonstrando que a suplementação com naringina é capaz de prevenir ou reverter os danos induzidos por diversos modelos de doenças, inclusive no SNC (AGGARWAL *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2010; ALAM *et al.*, 2014; JEONG *et al.*, 2015; ADIL *et al.*, 2016b). No entanto, esses trabalhos são realizados, em sua maioria, em animais adultos e, até o momento, não foram avaliados os efeitos que a suplementação com naringina durante a gestação pode desencadear nas mães no decorrer da gestação e também no desenvolvimento fetal, especialmente o do SNC, visto que nesse período o mesmo é altamente susceptível a intervenções (FERNANDEZ-TWINN e OZANNE, 2010; CAROLAN-OLAH *et al.*, 2015).

Assim, nesta parte do trabalho, buscamos avaliar a evolução da prenhez nas ratas mães que foram submetidas à suplementação com naringina durante a gestação, bem como o desenvolvimento da prole no período pós-natal. Dessa forma, uma maneira de acompanhar tanto o percurso da gestação nas mães, como o desenvolvimento da prole após o nascimento, é através da avaliação dos parâmetros reprodutivos e da execução das avaliações físicas, anatômicas e dos testes de neurodesenvolvimento e comportamentais na prole (GALLAHUE, 2013; MARCELINO *et al.*, 2013; PAPALIA, 2013).

O desenvolvimento, segundo GALLAHUE (2013), pode ser definido como a mudança progressiva no grau de funcionamento de um indivíduo no decorrer do tempo, e que pode sofrer influência de fatores hereditários e

ambientais. Dessa maneira, o autor classifica o desenvolvimento humano nos primeiros estágios da vida em quatro fases: (1) fase do movimento reflexo, (2) fase do movimento rudimentar, (3) fase do movimento fundamental e (4) fase do movimento especializado, sendo que a primeira fase corresponde, em termos de idade, ao primeiro ano de vida do indivíduo, e a última ao período da adolescência em diante. No entanto, esse modelo não consegue ser aplicado em sua totalidade quando usado para modelos animais, exceto pela primeira fase, a do movimento reflexo.

Sendo assim, os reflexos de endireitamento de superfície, aversão à queda e geotaxia negativa foram avaliados juntamente com o teste de suspensão em barra. Ambos os reflexos de aversão à queda e geotaxia negativa não demonstraram resultados estatisticamente significativos quando os filhotes nascidos de ratas controle foram comparados aos filhotes nascidos de ratas suplementadas com naringina durante a gestação. No entanto, no teste de endireitamento de superfície, houve um atraso estatisticamente significativo no DPN2 no desempenho dos filhotes nascidos de ratas suplementadas em relação aos filhotes controle. Já no teste de suspensão em barra também não encontramos resultados significativos.

Ademais, os comportamentos reflexos podem ser divididos em três fases na medida em que o cérebro se desenvolve: (1) reflexos primitivos, relacionados à sobrevivência e proteção, como o reflexo de aversão à queda, (2) reflexos posturais, relacionados a percepção e a orientação do próprio corpo, como o reflexo de endireitamento de superfície, e (3) reflexos locomotores, relacionados ao movimento voluntário, como o reflexo de geotaxia negativa (GALLAHUE, 2013; PAPALIA, 2013). Dessa forma, nosso resultado no DPN2

no teste de endireitamento de superfície pode indicar um possível atraso no desenvolvimento das regiões cerebrais da prole relacionadas à percepção e orientação do corpo causado pela suplementação materna com naringina durante a gestação. No entanto, não observamos nenhum resultado significativo nos outros dias, o que indica que a prole exposta à naringina durante a gestação recuperou essa função a níveis de controle ao longo do desenvolvimento.

Apesar da alteração encontrada no teste de endireitamento de superfície no DPN2, as avaliações maternas e os outros parâmetros analisados nos filhotes não demonstraram alterações. Além disso, também não observamos resultados significativos quando analisados os dias em que a prole começou a demonstrar os reflexos analisados, sugerindo que o atraso encontrado no DPN2 não está relacionado com o desenvolvimento do reflexo, mas sim apenas com o tempo de sua execução. Ademais, no que se refere ao acompanhamento do ganho de peso de mães e filhotes, bem como o desempenho nos testes de campo aberto e reconhecimento de objetos, também não encontramos diferenças significativas entre grupos controle e naringina, sugerindo, assim, que a suplementação materna com naringina não alterou o aporte de nutrientes recebidos durante o período fetal, bem como a função mnemônica dos filhotes machos no DPN21.

#### **3.1.4. Conclusão**

Assim, podemos concluir que a suplementação materna com naringina durante a gestação não foi capaz de alterar os parâmetros reprodutivos analisados em nosso trabalho, bem como a maioria das avaliações realizadas na prole. Porém, no DPN2, os filhotes apresentaram um atraso na realização do teste de endireitamento de superfície, o que pode sugerir um atraso no desenvolvimento das estruturas relacionadas ao controle desse reflexo, no entanto, esse déficit parece estar relacionado apenas ao tempo de realização do teste, e não à ontogenia do reflexo.

### **3.2. Capítulo II**

Neste capítulo apresentamos os principais resultados desta dissertação, que levaram à elaboração de um artigo científico. Aqui demonstramos que a suplementação com naringina durante toda a gestação alterou a homeostase redox e a função mitocondrial em diferentes estruturas cerebrais em filhotes fêmeas nascidas de ratas que foram suplementadas quando prenhas. Além disso, os efeitos observados na prole foram específicos em cada estrutura cerebral, persistindo até idades mais avançadas em algumas estruturas.

Autores: Bernardo Gindri dos Santos, Caroline Peres Klein, Pauline Maciel August, Mariana Scortegagna Crestani, Régis Mateus Hözer, André Brum Saccomori, Bárbara Mariño Dal Magro, Vinícius Stone e Cristiane Matté.

Status do artigo científico: Submetido ao periódico Free Radical Research em 19/01/2018.

**Naringin, a citrus flavonoid, alters offspring's brain redox system and mitochondrial function when supplemented to pregnant rats during gestation**

dos Santos, B. G<sup>1</sup>; Klein, C. P<sup>1</sup>; August, P. M<sup>1</sup>; Crestani, M. S<sup>2</sup>; Hozer, R. M<sup>2</sup>; Saccomori, A. B<sup>2</sup>; Dal Magro, B. M<sup>2</sup>; Stone, V<sup>1</sup>; Matté, C<sup>1,2</sup>

**Authors affiliation**

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

**Corresponding author**

Cristiane Matté

E-mail address: [matte@ufrgs.br](mailto:matte@ufrgs.br)

Phone: +55 51 3308 5548, Fax: +55 51 3308 5535

Address: Rua Ramiro Barcelos, 2600-Anexo, Porto Alegre, RS, Brazil

Zip Code: 90035-003

**Word count:** 8,695 (with references)



## **ABSTRACT**

Naringin consumption is known to improve brain redox status and cognitive function in adults, however, little is known about the effects of maternal naringin supplementation during pregnancy on offspring's brain redox system. Herein, pregnant Wistar rats were supplemented daily with naringin (100 mg/kg) throughout gestation. On different postnatal ages, pups' prefrontal cortex, hippocampus, striatum, and cerebellum redox system and mitochondrial function were assessed. Thereby, our observations have demonstrated that naringin supplementation to pregnant rats during gestation differentially affected the redox system and mitochondrial function in the brain structures analyzed, mainly on postnatal day (PND) 1. However, as we further investigated the redox and mitochondrial parameters on other postnatal ages, we observed a reduced number of alterations on prefrontal cortex, hippocampus, and striatum on PND7 and PND21, with exception of the cerebellum, which had persistent alterations until PND21, indicating a greater susceptibility of this structure to programming effects triggered by maternal naringin consumption during pregnancy. Thus, our findings demonstrated a possible negative programming effect triggered by maternal naringin supplementation during pregnancy in offspring's brain, especially on cerebellum.

**Keywords:** naringin; prenatal programming; brain redox system; mitochondria; pregnancy; flavonoids

## Introduction

Over the last decades, extensive research has been focusing on plants flavonoids due to their diverse biological effects and increasing presence in the human diet (WILLIAMS *et al.*, 2016). Flavonoids are known to be redox active molecules, and have well documented anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-carcinogenic, cardioprotective and neuroprotective properties, which support research employing them as potential pharmacological approaches or nutritional supplements (MANACH *et al.*, 2004; YU *et al.*, 2005). One of these promising molecules is naringin, chemically known as 4',5,7-trihydroxyflavanone-7-rhamnoglucoside, a flavanone mainly found in citrus fruits as rough lemon or grapefruit (BHARTI *et al.*, 2014). It has two glucose molecules attached to its flavonoid basic chemical structure, which confers it increased water solubility when compared to other aglycone flavanones (BHARTI *et al.*, 2014). Moreover, as a flavonoid glycoside, naringin may be absorbed in the intestine by sodium-dependent glucose transporters, or it can be previously deglycosylated by glycosidases in the intestinal lumen to its aglycone form, naringenin, which is more lipophilic than naringin and can be further absorbed by passive diffusion (KUMAR e PANDEY, 2013; LEWANDOWSKA *et al.*, 2013). In fact, following absorption, some studies have demonstrated accumulation of naringin metabolites in different tissues, including the brain, after intragastric naringin administration, which supports its use as a potential therapeutic method for several chronic diseases in the central nervous system (CNS) (EL MOHSEN *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2010; LEWANDOWSKA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013; GOLECHHA *et al.*, 2014; JUNG *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2014; MANI, 2014; CHTOUROU *et al.*, 2015c; XIAO, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). However, despite the interest on using naringin as potential pharmacological approach/nutritional supplement, little attention is given to how its consumption during

pregnancy might exert unexpected effects on fetal neurodevelopment via developmental programming.

In fact, recent studies have been demonstrating unpredictable effects in fetal tissues due to maternal consumption of phenolic compounds. On one hand, clinical studies have demonstrated altered flow dynamics of the ductus arteriosus in fetus exposed to polyphenols during the third trimester pregnancy (ZIELINSKY *et al.*, 2010; ZIELINSKY e BUSATO, 2013; ZIELINSKY *et al.*, 2013; ZIELINSKY *et al.*, 2014). On the other hand, animal data show inconclusive effects on whether maternal polyphenols consumption might be beneficial or detrimental to the fetus (VANHEES *et al.*, 2011; VANHEES *et al.*, 2013; BALAN *et al.*, 2017; MEENA *et al.*, 2017). Thereby, the lack of data on how polyphenols consumption during pregnancy might affect infant's health demonstrates the need to clarify how intrauterine exposure to phenolic compounds might impact fetal development, especially in the CNS.

Thus, considering the insufficient research concerning polyphenols supplementation and fetal neurodevelopment, and the redox potential of naringin, we sought to evaluate the effects of maternal naringin supplementation during pregnancy on offspring brain redox system and mitochondrial function parameters. Thereby, in our experimental design, we analyzed pup's prefrontal cortex, hippocampus, striatum, and cerebellum at different ages in order to follow any possible developmental programming of the redox network and mitochondrial function triggered by maternal intragastric naringin administration to rat dams on different time points of brain development in pups.

## **Methods**

### ***Animals***

Pregnant 90 days-old (200-250 g, 100 animals) Wistar rats were obtained from the animal facility in Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil. The animal facility was under controlled light (12:12 hour light/dark cycle), temperature ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ), and humidity conditions (50–60%). Rats were housed in three per cage until one day before delivery, when pregnant rats were exclusively allocated one per cage. After delivery, the litter was maintained with its mother until weaning. Throughout the experiment, all animals had free access to a 20% (w/w) protein commercial chow and water *ad libitum*.

### ***Ethical procedures***

The experimental design and procedures were approved by a local Ethics Commission on Animal Use (Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFRGS), protocol number 31397. Experiments were performed in accordance with the National Animal Rights Regulations (Law 11.794/2008), the American National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication No. 80-23, revised 1996), and the Directive 2010/63/EU. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

### ***Experimental design***

Naringin was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Briefly, pregnant rats were randomly divided into two experimental groups treated by oral gavage: control group, which received vehicle (double distilled water, 5 mL/kg), and naringin group (100 mg/kg). The treatment schedule was carried out during whole pregnancy, usually 21 days, and the delivery day was considered PND zero. On PND1, PND7, and PND21, female pups were randomly picked from each control and naringin

litter and further euthanized by decapitation without anesthesia in order to avoid tissue chemical contamination. Prefrontal cortex, hippocampus, striatum, and cerebellum were dissected and stored at -80 °C until further processing for most of the essays, except for flow cytometry.

### ***Sample preparation***

#### *Flow cytometry*

Flow cytometry was carried out based on MARCELINO *et al.* (2013). Briefly, fresh tissue samples were dissociated in PBS containing 1 mg% of collagenase IV and 0.5 mg% of DNase. Dissociated cells were then filtered using a 40 µm pore size cell strainer (SPL Lifesciences Co., Naechon-Myeon Pocheon, South Korea), and then incubated at 37 °C with the molecular probes. Cells were gated based on the FSC and SSC pattern of the sample cells and 30,000 events were acquired per sample in a FACScalibur flow cytometer (BD Biosciences); a non-labeled sample was used as negative fluorescent control. Data were analyzed using the software FlowJo.

#### *Redox state parameters*

Brain structures were homogenized (1:10 w/v) in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 140 mM KCl, and centrifuged at 750 x g for 10 minutes at 4 °C. The pellet was discarded and the supernatant used for the biochemical essays.

#### *Mitochondrial enzymes activity*

Samples were homogenized (1:10 w/v) in SETH buffer with 250 mM sucrose, 2 mM EDTA, 10 mM base trizma, and 50 UI/ml heparin, pH 7.4. The samples were then centrifuged at 800 x g for 10 min at 4 °C. The supernatant was used to evaluate enzymes activity.

## ***Biochemical essays***

### *Determination of total oxidants*

Total content of reactive oxygen and nitrogen species was evaluated by flow cytometry using 10  $\mu\text{M}$  2',7'-dichlorofluorescein diacetate, after 37 °C incubation with samples during 30 min ( $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ ; Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

### *Mitochondrial superoxide*

Mitochondrial superoxide was measured by flow cytometry using 1  $\mu\text{M}$  MitoSOX® Red after 20 min incubation at 37 °C (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

### *Nitric oxide*

Nitric oxide content was measured by flow cytometry using 10  $\mu\text{M}$  4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate after 1h incubation with samples at 37 °C (DAF-FM; Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA).

### *Superoxide dismutase*

Superoxide dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) activity was evaluated by quantifying the inhibition of the autoxidation of epinephrine by SOD at 480 nm. Considering the protocol used in sample preparation, we measured total SOD activity, expressed as the amount of enzyme that inhibits the oxidation of epinephrine by 50%, which is equal to one unit. The data were calculated as units/mg protein (MISRA e FRIDOVICH, 1972).

### *Catalase*

Catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) activity was evaluated by measuring the decrease of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) at 240 nm in a reaction medium containing 20 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.1% Triton X-100, and 10mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. One CAT unit is defined as 1  $\mu\text{mol}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumed per minute and the specific activity is reported as units/mg protein (AEBI, 1984).

### *Glutathione peroxidase*

Glutathione peroxidase (GPx) (EC 1.11.1.9) activity was evaluated by the decrease of NADPH concentration at 340 nm. The reaction medium contained 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.7, containing 1 mM EDTA, 2 mM reduced glutathione, 0.15 U/mL glutathione reductase (GR, EC 1.8.1.7), 0.4 mM azide, 0.1 mM NADPH, and 0.5 mM tert-butyl hydroperoxide as enzyme substrate. GPx unit is defined as 1  $\mu\text{mol}$  of NADPH consumed per minute and the specific activity is represented as Units/mg protein (WENDEL, 1981).

### *Glutaredoxin*

Glutaredoxin (Grx) (EC 1.20.4.1) activity was evaluated using hydroxyethyl disulfide (HED) as substrate. NADPH disappearance was followed at 340 nm in a reaction medium containing 2.5 mM glutathione, 454 U/mL (GR), 2 mM HED and 5 mM NADPH. One Grx unit is defined as 1  $\mu\text{mol}$  of NADPH consumed per minute, and the specific activity is represented as units/mg protein (HOLMGREN e ASLUND, 1995).

### *Thioredoxin reductase*

Thioredoxin reductase (TrxR) (EC 1.8.1.9) activity is measured by following the oxidation of NADPH along with reduction of one molecule of DTNB to 2TNB molecules at 412 nm. One unit of TrxR is defined as the amount of enzyme needed to catalyze the oxidation of 1  $\mu$ mol of NADPH per minute, and the specific activity is represented as units/mg protein (ARNER e HOLMGREN, 2001).

### *Glyoxalase 1*

Glyoxalase 1 (GLO1) (EC 4.4.1.5) activity was measured by following the increase in the S-D-lactoylglutathione at 240 nm. The essay takes place in a reaction medium of 60 mM sodium phosphate buffer, pH 6.6, with reduced glutathione 0.01 M and methylglyoxal 0.01 M. GLO1 unit is defined as the amount of enzyme needed to catalyze the formation of 1  $\mu$ mol of S-D-lactoylglutathione per minute, and the specific activity is represented as units/mg protein (THORNALLEY e TISDALE, 1988).

### *Total reduced glutathione*

Initially, the proteins in supernatant were precipitated with meta-phosphoric acid (1:1, v/v), and centrifuged at 5,000 g for 10 min at 25 °C. Reduced glutathione (GSH) present in the supernatant reacts with the fluorophore o-phthaldialdehyde 7.5 mM prepared in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 8.0, with 5 mM EDTA. The fluorescence was read at excitation and emission wavelengths of 350 nm and 420 nm, respectively, using the SpectraMax Gemini XS Fluorescence microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Standard GSH curve ranging from 0.001 to 1 mM was prepared and a blank sample was performed in parallel. Data were expressed as nmol of GSH/mg protein (BROWNE e ARMSTRONG, 1998).



### *Total thiol content*

Thiol (SH) content technique is based on the reduction of 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) by thiols, generating a yellow derivative (TNB). Briefly, 10 mM DTNB was dissolved in 0.2 M dibasic potassium phosphate buffer. Later, 20  $\mu$ L of sample were added to the medium containing DTNB and to the buffer without DTNB and incubated during 30 min at room temperature. The absorbance was measured at 412 nm (AKSENOV e MARKESBERY, 2001). Results are expressed as nmol TNB/mg protein.

### *Protein carbonyl content*

Carbonyl content was assessed according to REZNICK e PACKER (1994). Protein carbonyls react with dinitrophenylhydrazine forming dinitrophenylhydrazone, a yellow compound that was detected at 370 nm. For carbonyl determination we first measured the protein content of the samples, and used an interval of 0.7-1 mg of protein for carbonyl assay. Then, an equal volume of 20% TCA was added to the microtubes following the 5 min incubation at 4 °C. Following the 5 min incubation, the samples were centrifuged at 4,000 g for 5 min at 4 °C. Then, the supernatant was discarded and suspended with 100  $\mu$ L of 0.2 M NaOH. Following, 100  $\mu$ L of 2 M HCl was added to the control samples and 100  $\mu$ L of 100 mM DNPH was added to the test samples, and both were incubated during 1 h at room temperature and shaken every 15 min during this period. Following the 1 h incubation, 100  $\mu$ L of 20% TCA was added to the samples, and again incubated during 5 min at 4 °C and then centrifuged at 20,000 g for 5 min at 4 °C. Then, the supernatant was discarded and the pellet was further washed three times with 500  $\mu$ L of ethyl acetate: ethanol (1:1 v/v) and centrifuged again at 20,000 g for 5 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellets were re-

suspended in 8 M urea pH 2.3. The samples were vortexed and incubated at 60 °C for 15 min. Then, the samples were centrifuged at 20,000g for 3 min and the absorbance was measured at 370 nm. Protein carbonyl content was expressed as nmol/mg protein.

#### *Mitochondrial mass and membrane potential*

Mitochondrial mass and membrane potential were assessed by flow cytometry using 100 nM MitoTracker® Green and 100 nM MitoTracker® Red after 45 min incubation with samples at 37 °C (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR - USA), respectively.

#### *Succinate:DCIP-oxidoreductase (complex II)*

Complex II (CII) activity was evaluated following the decrease in absorbance due to reduction of 2,6-dichloroindophenol (DCIP) at 600 nm. The reaction medium consisted in 62.5 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, 250 mM succinate, and 0.5 mM DCIP, which was pre-incubated with 10 µL of homogenized sample at 30 °C for 10 min. Then, 100 mM sodium azide and 2 mM rotenone were added. The reaction started upon addition of 0.5 mM DCIP and was verified during 5 min. The activity was calculated as  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$  (FISCHER *et al.*, 1985).

#### *Succinate:phenazine oxidoreductase (Succinate dehydrogenase)*

Succinate dehydrogenase (SDH) activity was determined by the decrease in the absorbance of DCIP at 600 nm in a reaction medium containing phenazine methosulfate (PMS). The reaction medium consisted in 62.5 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, 250 mM succinate, and 0.5 mM DCIP, which was pre-incubated with 10 µL of homogenized sample at 30 °C for 10 min. Then, 100 mM sodium azide, 2 mM rotenone, and 0.5 mM DCIP were added. The reaction started upon addition of 24 mM PMS and

was verified during 5 min. The activity was calculated as  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$  (FISCHER *et al.*, 1985).

#### *Cytochrome c oxidase (complex IV)*

Cytochrome c oxidase (CIV) activity was evaluated by following the decrease in absorbance due to cytochrome c oxidation by CIV (RUSTIN *et al.*, 1994) with slightly modifications based on DA SILVA *et al.* (2002). The reaction medium consisted in 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0. Then, a mix of 0.8 mM cytochrome c and 0.4 M sodium borohydrate was added to the medium with samples, starting the reaction which was followed at 550 nm during 10 min at 25 °C. The activity was calculated as  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ .

#### *Total protein content*

Protein concentration was measured according to LOWRY *et al.* (1951), using bovine serum albumin as standard.

#### *Statistical analysis*

All data were tested for normality before analyzed by Student's *t* test, for parametric results, or Mann Whitney's *U* test, for non-parametric results, by GraphPad Prism 6.0 software. Here, results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

## **Results**

*Maternal naringin supplementation during pregnancy disrupts redox system and reduces mitochondrial mass and membrane potential in pups' prefrontal cortex on PND1 but not on PND7 and PND21*

Total oxidants, mitochondrial superoxide, and nitric oxide contents were evaluated by flow cytometry on PND1, PND7, and PND21 through DCFH oxidation, MitoSOX® Red, and DAF-FM molecular probes, respectively. DCFH oxidation and mitochondrial superoxide levels were not altered in prefrontal cortex of pups born to naringin treated dams on PND1 [t(18)=0.080; p=0.937; t(19)=0.354; p=0.727; respectively], PND7 [t(14)=0.772; p=0.453; t(13)=0.322; p=0.752; respectively], and PND21 [t(13)=0.582; p=0.570 t(14)=1.894; p=0.079; respectively]. In contrast, DAF-FM oxidation was increased on PND1 [t(19)=2.459; p=0.024], but not on PND7 [t(14)=0.943; p=0.362] and PND21 [t(14)=1.628; p=0.126] (Figure 1).

Measuring antioxidant enzymes, we demonstrated increased SOD activity in prefrontal cortex of pups born to naringin treated dams on PND1 [t(11)=3.011; p=0.018], but not on PND7 and PND21 [t(10)=1.721; p=0.116; t(10)=1.721; p=0.116; respectively]. Concerning CAT activity, we observed an increase in prefrontal cortex of pups born to naringin treated dams on PND7 [t(12)=2.248; p=0.044], however, we did not observed any difference in CAT activity on PND1 [t(14)=0.008; p=0.993] and PND21 [t(11)=1.664; p=0.124] (Figure 2). Increased TrxR activity was also observed on PND1 [t(12)=3.272; p=0.007], despite no differences were found on PND7 [t(11)=0.084; p=0.934] and PND21 [t(11)=1.888; p=0.086]. GPx and Grx activities in prefrontal cortex of pups born to naringin treated dams were similar to control group at all ages; on PND1 [t(13)=1.111; p=0.286; t(11)=2.057; p=0.064; respectively], PND7 [t(12)=0.420; p=0.682; t(12)=0.269; p=0.793; respectively], and PND21 [t(11)=0.301; p=0.769; t(10)=0.070; p=0.945; respectively]. GLO1 activity remained unaltered on PND1 [t(13)=1.283; p=0.222], PND7 [t(9)=1.559; p=0.153] and PND21 [t(12)=0.426; p=0.677] (Figure 2).

Total thiol content and protein carbonyl levels were increased in prefrontal cortex of PND1 pups prenatally exposed to naringin [t(13)=2.718; p=0.017; and t(10)=3.655; p=0.004, respectively], however, no alterations on these parameters were observed on PND7 [t(12)=0.203; p=0.842; t(7)=1.357; p=0.217; respectively] and PND21 [t(10)=0.124; p=0.904; t(12)=0.356; p=0.728; respectively]. GSH content remained unchanged on PND1, PND7, and PND21 [t(13)=1.7097; p=0.111; t(15)=0.261; p=0.797; t(10)=0.124; p=0.904; respectively] (Figure 3).

Interestingly, mitochondrial mass and membrane potential were decreased in prefrontal cortex of naringin pups on PND1 [t(18)=2.899; p=0.009; t(15)=2.510; p=0.024; respectively], however, the values of such parameters returned to control levels on PND7 [t(11)=0.985; p=0.346; t(12)=0.947; p=0.362, respectively], culminating in increased mitochondrial mass on PND21 [t(13)=2.550; p=0.024], despite unchanged mitochondrial membrane potential [t(14)=1.631; p=0.125] (Figure 4). Concerning electron transport system enzymes activities, we observed that CII activity decreased on PND7 in prefrontal cortex of naringin pups [t(10)=2.815; p=0.018], but remained unchanged on PND1 [t(12)=0.306; p=0.765] and on PND21 [t(12)=0.418; p=0.683]. SDH and CIV activities remained unchanged on PND1 [t(12)=1.116; p=0.286; t(12)=0.460; p=0.653], PND7 [t(12)=1.781; p=0.100; t(10)=0.631; p=0.542] and PND21 [t(12)=0.946; p=0.363; t(9)=1.526; p=0.161] (Figure 5).

***Disrupted redox system was found in hippocampus of offspring born to naringin treated rats on PND1 and PND7, but not on PND21***

In the hippocampus of pups, our results demonstrated that maternal naringin treatment during pregnancy triggered a reduction on total oxidant levels on PND1 [t(18)=2.733; p=0.014], however, no alterations were observed on PND7 [t(14)=0.728;

p=0.478] and PND21 [t(14)=0.824; p=0.423] (Figure 6). Levels of mitochondrial superoxide [t(19)=1.177; p=0.254], and nitric oxide [t(18)=1.669; p=0.112] remained unchanged on PND1, but both were found to be decreased on PND7 [t(14)=3.028; p=0.009; t(12)=2.448; p=0.031; respectively], and unchanged on PND21 [t(14)=0.347; p=0.734; t(13)=2.021; p=0.064; respectively] (Figure 6).

Decreased GPx [t(13)=2.2858; p=0.0396] and Grx [t(14)=3.300; p=0.005] activities were observed in hippocampus of naringin pups, however, no difference was observed on GPx [t(12)=0.752; p=0.467] activity on PND7, while Grx [t(10)=2.378; p=0.039] activity was increased at this age. Both enzymes activities remained unchanged on PND21 [t(11)=1.585; p=0.141; t(12)=0.105; p=0.918; respectively] (Figure 7). SOD, CAT, TrxR, and GLO1 activities remained unaltered on PND1 [t(10)=1.731; p=0.114; t(14)=1.556; p=0.142; t(12)=1.791; p=0.098; t(14)=1.198; p=0.251; respectively], PND7 [t(11)=0.912; p=0.381; t(12)=0.687; p=0.505; t(11)=1.160; p=0.270; t(11)=2.069. p=0.0628; respectively], and PND21 [t(10)=1.065; p=0.312; t(11)=0.921; p=0.377; t(12)=1.537; p=0.150; t(11)=1.007; p=0.335, respectively] (Figure 7).

No alteration in GSH, total SH, and carbonyl contents in pup's hippocampus were found on PND1 [t(12)=1.2980; p=0.2186; t(12)=0.5073; p=0.6211; t(11)=0.0945; p=0.9263, respectively], PND7 [t(12)=0.3198; p=0.7545; t(10)=0.6912; p=0.5051; t(12)=0.5874; p=0.5677, respectively], and PND21 [t(11)=1.2653; p=0.2318; t(12)=0.6665; p=0.5176; t(9)=0.4873; p=0.6376, respectively] (Figure 8).

Decreased mitochondrial mass was observed in pup's hippocampus on PND1 [t(15)=2.9315; p=0.0103], along with no changes on PND7 [t(14)=1.0839; p=0.2967] and PND21 [t(14)=1.1038. p=0.2882]. Mitochondrial membrane potential remained

unchanged on PND1 [t(15)=1.2062; p=0.2464], PND7 [t(14)=1.1405; p=0.2732] and PND21 [t(14)=0.0762. p=0.9403] (Figure 9). Neither mitochondrial enzymes activities were altered on PND1 [CII: t(12)=0.5252; p=0.6089, SDH: t(12)=1.2370; p=0.2397, CIV: t(12)=0.4268; p=0.6770], PND7 [CII: t(12)=0.3718; p=0.7164, SDH: t(12)=1.6486; p=0.1251, CIV: t(12)=0.9603; p=0.3558], nor PND21 [CII: t(10)=0.1044; p=0.9189, SDH: t(12)=0.8911; p=0.3903, CIV: t(10)=0.1044; p=0.9189] (Figure 10).

***Maternal naringin treatment during pregnancy alters thiol homeostasis in offspring striatum on PND7***

On PND1 total oxidants and nitric oxide [t(15)=2.0534; p=0.0578; t(17)=2.0509; p=0.0560; respectively] levels remained unchanged, and the same was observed on PND7 [t(14)=1.1758; p=0.2592; t(14)=0.9998; p=0.3343; respectively] and PND21 [t(13)=0.1824; p=0.8580; t(14)=0.3408; p=0.7382; respectively] (Figure 11). Moreover, no differences on mitochondrial superoxide levels were observed on PND1 [t(19)=1.5376; p=0.1406], but decreased levels were found on PND7 [t(14)=2.4614; p=0.0274], and returned to control levels on PND21 [t(14)=1.0295; p=0.3206] (Figure 11).

SOD activity was not changed, when compared to control, on PND1 [t(12)=1.5759; p=0.1410], and remained the same on PND7 [t(11)=1.3957; p=0.1903], and PND21 [t(12)=1.3850; p=0.1912]. However, on PND1, we observed an increased CAT [t(13)=3.5024; p=0.0038] activity, which did not persist on PND7 [t(12)=1.0239; p=0.3260] and PND21 [t(11)=0.7327; p=0.4790]. TrxR activity was found to be increased only on PND7 [t(10)=4.0942; p=0.0021], while it remained in control levels on PND1 [t(12)=2.0357; p=0.0644] and PND21 [t(12)=1.2116; p=0.2489] (Figure 12). GPx, Grx, and GLO1 activities remained unchanged on PND1 [t(13)=2.1186;

p=0.0539; t(12)=0.9967; p=0.3385; t(15)=0.4248; p=0.6769, respectively], PND7 [t(12)=0.8900; p=0.3909; t(12)=1.4944; p=0.1608; t(9)=0.9033; p=0.3898; respectively], and PND21 [t(13)=0.3426; p=0.7373; t(13)=0.7177; p=0.4855; t(12)=0.1992; p=0.8454; respectively] (Figure 12).

No differences were observed on GSH on PND1 [t(14)=0.3392; p=0.7394], however, on PND7 GSH levels were increased [t(13)=2.6901; p=0.0185], returning to control levels on PND21 [t(9)=0.3622; p=0.7255]. The same pattern was observed on total SH content, with no differences on PND1 [t(12)=1.7560; p=0.1045], increased on PND7 [t(18)=2.8328; p=0.0110], and returned to control levels on PND21 [t(9)=0.6443; p=0.5354]. Moreover, carbonyl levels were not altered on PND1 [t(11)=0.3579; p=0.7271] and PND7 [t(6)=0.3067; p=0.7694] nevertheless, were increased on PND21 [t(11)=3.0501; p=0.0110] (Figure 13).

It was not observed any alterations on mitochondrial mass and membrane potential on PND1 [t(14)=0.0676; p=0.9469; t(14)=0.0943; p=0.9261; respectively], PND7 [t(12)=1.1196; p=0.2847; t(12)=0.9461; p=0.3627; respectively], and PND21 [t(13)=0.1678; p=0.8692; t(13)=1.2824; p=0.2220; respectively] (Figure 14). However, reduced SDH activity was observed on PND1 [t(12)=2.5547; p=0.0252], despite no alterations on PND7 [t(12)=0.9427; p=0.3643] and PND21 were observed [t(11)=2.1615; p=0.0535] (Figure 15). No other changes were observed on CII and CIV activities on PND1 [t(12)=0.0600; p=0.9531; t(11)=2.0358; p=0.0665; respectively], PND7 [t(12)=0.6376; p=0.5356; t(12)=0.1742; p=0.8645; respectively], or PND21 [t(11)=1.6091; p=0.1358; t(10)=0.4426; p=0.6674; respectively] (Figure 15).

***Naringin supplementation to pregnant rats during entire pregnancy alters cerebellar redox system and mitochondrial enzymes on PND21***



Cerebellar tissue obtained from pups prenatally exposed to naringin demonstrated no alterations regarding total oxidants on PND1 [t(19)=0.7011; p=0.4917], PND7 [t(13)=0.5491; p=0.5922] and PND21 [t(14)=0.3677; p=0.7185]. The same was observed concerning mitochondrial superoxide levels on PND1 [t(18)=1.5449; p=0.1397], PND7 [t(14)=0.6367; p=0.5345], and PND21 [t(14)=0.0546; p=0.9572]. Interestingly, despite no alterations on nitric oxide content on PND1 [t(18)=1.0631; p=0.3017], it was found to be increased on PND7 [t(13)=2.9247; p=0.0118] and decreased on PND21 [t(13)=2.9190; p=0.0119] (Figure 16).

SOD activity remained unchanged on PND1 [t(13)=0.9664; p=0.3514], PND7 [t(12)=1.1765; p=0.2621], and PND21 [t(12)=0.0695; p=0.9456] (Figure 17). The same was observed concerning CAT activity on PND1 [t(11)=0.5395; p=0.6002] and PND7 [t(12)=0.9409; p=0.3653], however, it was decreased on PND21 [t(10)=2.8063; p=0.0185]. Interestingly, Grx activity was not altered on PND1 [t(14)=1.3216; p=0.2074], increased on PND7 [t(11)=2.6572; p=0.0224], and decreased on PND21 [t(11)=2.5143; p=0.0287]. No alterations were found on GPx, TrxR, and GLO1 on PND1 [t(12)=0.5111; p=0.6185; t(12)=0.5407; p=0.5985; t(12)=0.4103; p=0.6887; respectively], PND7 [t(12)=0.2358; p=0.8175; t(11)=0.0142; p=0.9888; t(9)=1.4397; p=0.1838; respectively], and PND21 [t(12)=0.8639; p=0.4045; t(11)=0.5136; p=0.6176; t(12)=1.0333; p=0.3218; respectively] (Figure 17).

Moreover, increased GSH content was observed in pups' cerebellum on PND1 [t(16)=2.4493; p=0.0262], returning to control levels on PND7 [t(12)=0.4845; p=0.6367], and found increased again on PND21 [t(11)=2.6625; p=0.0220]. Total SH and carbonyl contents remained unchanged on PND1 [t(13)=1.2682; p=0.2269; t(10)=1.8293; p=0.0972; respectively], PND7 [t(12)=1.0638; p=0.3083; t(11)=0.9815;

p=0.3474; respectively] and PND21 [t(9)=0.2452; p=0.8117; t(11)=0.1396; p=0.8914; respectively] (Figure 18).

Concerning mitochondrial parameters, here we found unaltered mitochondrial mass on all ages [PND1: t(12)=1.2726; p=0.2272, PND7: t(13)=0.8877; p=0.3908, PND21: t(14)=0.4196; p=0.6811], however, mitochondrial membrane potential was reduced on PND1 [t(15)=2.5797; p=0.0209], remained reduced on PND7 [t(12)=2.5214; p=0.0268], but returned to control levels on PND21 [t(14)=0.2109; p=0.8359] (Figure 19). Interestingly, mitochondrial CIV activity was increased on PND1 [t(12)=2.8252; p=0.0153], returned to control levels on PND7 [t(12)=0.7452; p=0.4704], and was decreased on PND21 [t(12)=2.4940; p=0.0282], while SDH activity was unchanged on PND1 [t(12)=2.1090; p=0.0566], remained unchanged on PND7 [t(12)=0.4284; p=0.6758], but was decreased on PND21 [t(12)=3.1250; p=0.0087]. CII activity was not altered on any age evaluated [PND1: t(12)=1.6528; p=0.1242, PND7: t(12)=1.2995; p=0.2181, PND21: t(12)=0.7054; p=0.4939] (Figure 20).

## **Discussion**

Naringin is a redox active flavonoid glycoside present in citrus fruits (SPENCER, 2008) that has been extensively studied in rodent models as potential nutraceutical approach due to its ability to exert neuroprotective effects and improve cognitive health (SPENCER, 2008; BHARTI *et al.*, 2014; JUNG *et al.*, 2014). However, despite increasing interest to use naringin to improve cognitive health, there is no available data concerning the possible impact of naringin supplementation during pregnancy on fetal brain development. Thus, here, we aimed to investigate the effects of naringin supplementation to pregnant rats in pups' prefrontal cortex, hippocampus,

striatum, and cerebellum redox system and mitochondrial function at different postnatal ages.

Our data demonstrated that pups' prefrontal cortex redox system and mitochondrial function were affected by maternal naringin treatment, especially on PND1. Here, we observed increased levels of nitric oxide on PND1 in pups born to naringin treated dams when compared to control pups. This alteration was found along with decreased mitochondrial mass and membrane potential, indicating a reduction in mitochondrial function, which is known to induce reactive species formation (CADENAS e DAVIES, 2000). However, despite the data demonstrating that naringin and naringenin are capable to modulate nitric oxide levels and mitochondrial function in different tissues and brain structures in adult rats, the alterations found on PND1 did not persist on PND7 and PND21, with exception of mitochondrial mass, which was statistically increased on PND21 (SACHDEVA *et al.*, 2014; ADIL *et al.*, 2016b). Also, on PND7, in which no changes on mitochondrial mass and membrane potential were found, CII activity was reduced, in contrast with other studies using adult rats which observed increased CII activity in cerebral cortex of okadaic acid exposed animals after naringin treatment (GAUR *et al.*, 2009; SACHDEVA *et al.*, 2014).

Moreover, pups born to naringin treated dams also exhibited impaired antioxidant system and oxidative markers. We observed increased SOD activity on PND1, which lead to the hypothesis that hydrogen peroxide could be increased, though, neither DCFH oxidation nor mitochondrial superoxide content were altered at any age. Also, we did not evaluate other superoxide sources outside the mitochondria, and with exception of CAT on PND7, no other enzyme responsible for peroxide elimination was altered in any other age. Thereby, other studies have also demonstrated the modulatory effects of naringin and its metabolite, naringenin, on SOD and CAT activities in

different models of CNS disorders (CHTOUROU *et al.*, 2014; MANI, 2014). Interestingly, we also found decreased TrxR activity on PND1, which is in contrast with HODKOVA *et al.* (2010) who demonstrated that 100 mg/kg naringin treatment did not affect TrxR activity in an iron (III) model of liver toxicity, but naringin *per se* increased TrxR activity. However, despite the reduction on TrxR activity, we also observed augmented total SH content on PND1, which is somewhat unexpected since TrxR is an essential component of the thioredoxin system, and we found no alterations on Grx activity and GSH content. Nonetheless, we did not analyze other SH dependent enzymes or sources of low molecular weight thiols. Moreover, this increase in total SH content could be an attempt to counteract the damage demonstrated by the increased carbonyl content observed in pups' prefrontal cortex also on PND1, since data demonstrates that naringin or naringenin treatment is capable to increase thiol content and reduce carbonyl content in toxicity models induced in rats and in cell culture (CHTOUROU *et al.*, 2014; RATHI *et al.*, 2017).

Hippocampus did not demonstrate any alteration on PND21, with most alterations found on PND1 and PND7. Decreased DCFH oxidation was observed concomitantly with decreased GPx and Grx activities on PND1, which might have happened due to the lack of enzymes substrates since DCFH generally indicates the total content of reactive species, specially hydrogen peroxide, and the activity of some peroxidases, as GPx (TARPEY e FRIDOVICH, 2001). In fact, other works using animal models have already demonstrated that 100 mg/kg naringin treatment decreased DCFH oxidation and increased GPx activity in hippocampus of adult rats and mice in different models of CNS disorders (CHTOUROU *et al.*, 2015b; WANG *et al.*, 2015). Moreover, these changes were also followed by decreased mitochondrial mass in the hippocampus on PND1. Thereby, on PND7, instead of altered DCFH oxidation, we

observed decreased nitric oxide and mitochondrial superoxide contents. However, despite both parameters were found decreased at this age, we did not observe any alterations on SOD activity, which might indicates that mitochondrial generated superoxide is reacting with nitric oxide, since nitric oxide levels are also decreased, generating peroxynitrite radical (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Thus, unlike PND1, on PND7 Grx activity was increased though no alterations on GSH and total SH levels were found. Moreover, other data have demonstrated that naringin and naringenin are capable to reduce superoxide and nitric oxide in total brain or paw skin of adult rats (MANCHOPE *et al.*, 2016; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2016).

Moreover, in striatum, on PND1, decreased SDH activity was observed concomitantly with increased CAT activity, both know to be modulated by naringin or naringenin treatment, but no other alterations were found on these parameters as well as mitochondrial markers evaluated here (SACHDEVA *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2017). Thereby, on PND7, most of the alterations found involved thiol homeostasis. In fact, other works have demonstrated increased GSH and SH content in different models of induced toxicity after naringin treatment, and even increased TrxR activity triggered by naringin alone in liver of adult Wistar rats (HODKOVA *et al.*, 2010; GOPINATH e SUDHANDIRAN, 2012; CHTOUROU *et al.*, 2014; RATHI *et al.*, 2017). Thereby, here, we found increased total SH content in striatum of naringin pups on PND7, which might have happened due to increased levels of GSH. Thus, TrxR is also important on thiol metabolism, because of its role in regenerating thioredoxins and, in some cases, glutaredoxins, however, no alterations on Grx activity were observed in our work (BERNDT *et al.*, 2007). These changes were also followed by decreased mitochondrial superoxide, though we found unchanged SOD activity. Also, on PND21, pups born to naringin treated dams also demonstrated

increased carbonyl content in striatum, even though no other alterations were found among the other parameters evaluated, which might be indicating a state of oxidative stress.

When considered the number of alterations, the cerebellum was the most affected brain structure among the ones analyzed in our work. Data elsewhere have already demonstrated that naringin is capable to modulate mitochondrial membrane potential in brain of adult obese rats and in a toxicity model using PC12 cells (KULASEKARAN e GANAPASAM, 2015; WANG *et al.*, 2015). In our model, reduced mitochondrial membrane potential was observed on PND1 and PND7, along with increased CIV activity and GSH content on the first age, and increased Grx activity and nitric oxide content on the other age. However, it is interestingly the fact that mitochondrial membrane potential returned to control levels on PND21, and it was accompanied by a shift on CIV activity, which was increased on PND1, and decreased on PND21 along with decreased SDH activity. Also, on PND21, decreased nitric oxide content, followed by decrease Grx and CAT activity together with increased GSH levels were observed, and, with exception of GSH levels and CAT activity, Grx and nitric oxide content were the opposite of what was observed on PND7. In fact, published data showed that naringin treatment to adult rats positively regulated CIV, SDH and CAT activities, and GSH content in different brain structures however, this regulation was found on toxicity models and a beneficial effect on these parameters due to naringin treatment was expected (VISWANATHA *et al.*, 2011; SACHDEVA e CHOPRA, 2015; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2016).

Thereby, the fact that the cerebellum showed most alterations, might have demonstrated a greater susceptibility of this brain structure to programming effects triggered by maternal naringin supplementation when compared to the other brain areas

analyzed here. Interestingly, the cerebellum also demonstrated persistent alterations, since we observed these changes up to PND21, while hippocampus, prefrontal cortex and striatum demonstrated none or just a few alterations at this age. We speculate if this might have happened because of the longer period of cerebellum development when compared to the other brain structures analyzed in our work (BAYER *et al.*, 1993; RICE e BARONE, 2000; BEKKEDAL *et al.*, 2004). Moreover, concerning the dose used in our model, dietary flavonoid supplementation is currently available in the market, with doses ranging from 500 mg/day to 1 g/day intake, including naringin supplements, and from this perspective the dose used here in our model is realistic when applying to human supplementation in the diet. (ESPIN *et al.*, 2007).

## **Conclusion**

Herein, we demonstrated that naringin supplementation to pregnant rats strongly disrupted offspring's redox system and mitochondrial function in different encephalic structures at different ages. At the earliest age, PND1, it seems that a negative modulation of the redox network occurred in prefrontal cortex, hippocampus, striatum, and cerebellum, contrasting to the progressive decline in the number of alterations observed on PND7 and PND21 in prefrontal cortex, hippocampus, and striatum. This shift might indicate a possible recovery of the programming effects triggered by maternal naringin consumption, with exception of the cerebellum, which presented persistent alterations until PND21 possibly due to a greater susceptibility of this encephalic structure to the developmental programming effects triggered by maternal naringin supplementation during pregnancy. Thereby, our findings demonstrate that caution needs to be taken when considering polyphenols/flavonoids supplementation during pregnancy, and evidence the requirement to further clarify how these

phytochemicals impact offspring's health and how long these alterations might last throughout adult life.

### **Acknowledgments**

This study was supported by FAPERGS, PROPESQ-UFRGS and CNPq (Universal 2014 and INCT 465671/2014-4).

### **Disclosure of interest**

The authors declare no conflict of interests.

### **References**

1. Williams RJ, Mohanakumar KP, Beart PM. Neuro-nutraceuticals: Further insights into their promise for brain health. *Neurochemistry international*. 2016 May;95:1-3. doi: 10.1016/j.neuint.2016.03.016. PubMed PMID: 27086712.
2. Yu J, Wang L, Walzem RL, et al. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005 Mar 23;53(6):2009-14. doi: 10.1021/jf0484632. PubMed PMID: 15769128.
3. Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*. 2004 May;79(5):727-47. PubMed PMID: 15113710.
4. Bharti S, Rani N, Krishnamurthy B, et al. Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. *Planta medica*. 2014 Apr;80(6):437-51. doi: 10.1055/s-0034-1368351. PubMed PMID: 24710903.
5. Lewandowska U, Szewczyk K, Hrabec E, et al. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013 Dec 18;61(50):12183-99. doi: 10.1021/jf404439b. PubMed PMID: 24295170.
6. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *TheScientificWorldJournal*. 2013;2013:162750. doi: 10.1155/2013/162750. PubMed PMID: 24470791; PubMed Central PMCID: PMC3891543.
7. Zhang Y, Liu B, Chen X, et al. Naringenin Ameliorates Behavioral Dysfunction and Neurological Deficits in a d-Galactose-Induced Aging Mouse Model Through Activation of PI3K/Akt/Nrf2 Pathway. *Rejuvenation research*. 2017 Jul 24. doi: 10.1089/rej.2017.1960. PubMed PMID: 28622086.



8. Chtourou Y, Slima AB, Gdoura R, et al. Naringenin Mitigates Iron-Induced Anxiety-Like Behavioral Impairment, Mitochondrial Dysfunctions, Ectonucleotidases and Acetylcholinesterase Alteration Activities in Rat Hippocampus. *Neurochemical research*. 2015 Aug;40(8):1563-75. doi: 10.1007/s11064-015-1627-9. PubMed PMID: 26050208.
9. Kumar A, Prakash A, Dogra S. Naringin alleviates cognitive impairment, mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by D-galactose in mice. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2010 Feb;48(2):626-32. doi: 10.1016/j.fct.2009.11.043. PubMed PMID: 19941926.
10. Golechha M, Sarangal V, Bhatia J, et al. Naringin ameliorates pentylenetetrazol-induced seizures and associated oxidative stress, inflammation, and cognitive impairment in rats: possible mechanisms of neuroprotection. *Epilepsy & behavior : E&B*. 2014 Dec;41:98-102. doi: 10.1016/j.yebeh.2014.09.058. PubMed PMID: 25461197.
11. Wang DM, Yang YJ, Zhang L, et al. Naringin Enhances CaMKII Activity and Improves Long-Term Memory in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(3):5576-86. doi: 10.3390/ijms14035576. PubMed PMID: 23478434; PubMed Central PMCID: PMC3634479.
12. Mani VMS, A. M. M. Naringin modulates the impairment of memory, anxiety, locomotor, and emotionality behaviors in rats exposed to deltamethrin; a possible mechanism association with oxidative stress, acetylcholinesterase and ATPase. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 2014;4:527-533. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bionut.2014.08.006>.
13. Jung UJ, Leem E, Kim SR. Naringin: a protector of the nigrostriatal dopaminergic projection. *Experimental neurobiology*. 2014 Jun;23(2):124-9. doi: 10.5607/en.2014.23.2.124. PubMed PMID: 24963276; PubMed Central PMCID: PMC4065825.
14. Xiao J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical reviews in food science and nutrition*. 2017 Jun 13;57(9):1874-1905. doi: 10.1080/10408398.2015.1032400. PubMed PMID: 26176651.
15. El Mohsen MA, Marks J, Kuhnle G, et al. The differential tissue distribution of the citrus flavanone naringenin following gastric instillation. *Free radical research*. 2004 Dec;38(12):1329-40. doi: 10.1080/10715760400017293. PubMed PMID: 15763957.
16. Lin SP, Hou YC, Tsai SY, et al. Tissue distribution of naringenin conjugated metabolites following repeated dosing of naringin to rats. *BioMedicine*. 2014;4:16. doi: 10.7603/s40681-014-0016-z. PubMed PMID: 25520929; PubMed Central PMCID: PMC4265019.
17. Zielinsky P, Busato S. Prenatal effects of maternal consumption of polyphenol-rich foods in late pregnancy upon fetal ductus arteriosus. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2013 Dec;99(4):256-74. doi: 10.1002/bdrc.21051. PubMed PMID: 24339037; PubMed Central PMCID: PMC4065350.
18. Zielinsky P, Martignoni FV, Vian I. Deleterious effects of maternal ingestion of cocoa upon fetal ductus arteriosus in late pregnancy.

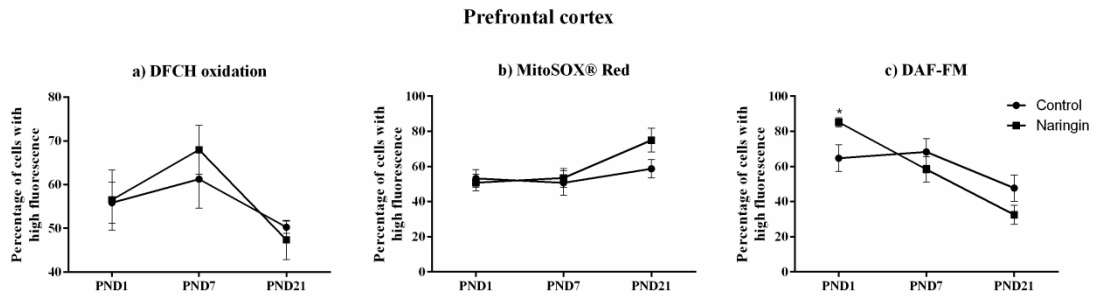
- Frontiers in pharmacology. 2014;5:281. doi: 10.3389/fphar.2014.00281. PubMed PMID: 25566077; PubMed Central PMCID: PMC4273632.
19. Zielinsky P, Piccoli AL, Jr., Manica JL, et al. Maternal consumption of polyphenol-rich foods in late pregnancy and fetal ductus arteriosus flow dynamics. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*. 2010 Jan;30(1):17-21. doi: 10.1038/jp.2009.101. PubMed PMID: 19641513; PubMed Central PMCID: PMC2834346.
  20. Zielinsky P, Piccoli AL, Jr., Vian I, et al. Maternal restriction of polyphenols and fetal ductal dynamics in normal pregnancy: an open clinical trial. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2013 Sep;101(3):217-25. doi: 10.5935/abc.20130166. PubMed PMID: 23949325; PubMed Central PMCID: PMC4032301.
  21. Vanhees K, van Schooten FJ, van Waalwijk van Doorn-Khosrovani SB, et al. Intrauterine exposure to flavonoids modifies antioxidant status at adulthood and decreases oxidative stress-induced DNA damage. *Free radical biology & medicine*. 2013 Apr;57:154-61. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.021. PubMed PMID: 23295412.
  22. Meena R, Supriya C, Pratap Reddy K, et al. Altered spermatogenesis, steroidogenesis and suppressed fertility in adult male rats exposed to genistein, a non-steroidal phytoestrogen during embryonic development. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2017 Jan;99:70-77. doi: 10.1016/j.fct.2016.11.020. PubMed PMID: 27884790.
  23. Vanhees K, Coort S, Ruijters EJ, et al. Epigenetics: prenatal exposure to genistein leaves a permanent signature on the hematopoietic lineage. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2011 Feb;25(2):797-807. doi: 10.1096/fj.10-172155. PubMed PMID: 21048042.
  24. Balan BJ, Skopinska-Rozewska E, Skopinski P, et al. Morphometric abnormalities in the spleen of the progeny of mice fed epigallocatechin during gestation and nursing. *Polish journal of veterinary sciences*. 2017 Mar 28;20(1):5-12. doi: 10.1515/pjvs-2017-0001. PubMed PMID: 28525335.
  25. Marcelino TB, Longoni A, Kudo KY, et al. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. *Neuroscience*. 2013 Aug 29;246:28-39. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.043. PubMed PMID: 23639877.
  26. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of biological chemistry*. 1972 May 25;247(10):3170-5. PubMed PMID: 4623845.
  27. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 1984;105:121-6. PubMed PMID: 6727660.
  28. Wendel A. Glutathione peroxidase. *Methods in enzymology*. 1981;77:325-33. PubMed PMID: 7329310.
  29. Holmgren A, Aslund F. Glutaredoxin. *Methods in enzymology*. 1995;252:283-92. PubMed PMID: 7476363.

30. Arner ES, Holmgren A. Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Current protocols in toxicology*. 2001 May;Chapter 7:Unit 7 4. doi: 10.1002/0471140856.tx0704s05. PubMed PMID: 20954152.
31. Thornalley PJ, Tisdale MJ. Inhibition of proliferation of human promyelocytic leukaemia HL60 cells by S-D-lactoylglutathione in vitro. *Leukemia research*. 1988;12(11-12):897-904. PubMed PMID: 2905755.
32. Browne RW, Armstrong D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods in molecular biology*. 1998;108:347-52. doi: 10.1385/0-89603-472-0:347. PubMed PMID: 9921543.
33. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters*. 2001 Apr 20;302(2-3):141-5. PubMed PMID: 11290407.
34. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods in enzymology*. 1994;233:357-63. PubMed PMID: 8015470.
35. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1985 Nov 29;153(1):23-36. PubMed PMID: 3000647.
36. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1994 Jul;228(1):35-51. PubMed PMID: 7955428; eng.
37. da Silva CG, Ribeiro CA, Leipnitz G, et al. Inhibition of cytochrome c oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Biochimica et biophysica acta*. 2002 Jan 02;1586(1):81-91. PubMed PMID: 11781152.
38. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951 Nov;193(1):265-75. PubMed PMID: 14907713.
39. Spencer JP. Flavonoids: modulators of brain function? *The British journal of nutrition*. 2008 May;99 E Suppl 1:ES60-77. doi: 10.1017/S0007114508965776. PubMed PMID: 18503736.
40. Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free radical biology & medicine*. 2000 Aug;29(3-4):222-30. PubMed PMID: 11035250.
41. Adil M, Kandhare AD, Ghosh P, et al. Ameliorative effect of naringin in acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity in laboratory rats: role of FXR and KIM-1. *Renal failure*. 2016 Jul;38(6):1007-20. doi: 10.3109/0886022X.2016.1163998. PubMed PMID: 27050864.
42. Sachdeva AK, Kuhad A, Chopra K. Naringin ameliorates memory deficits in experimental paradigm of Alzheimer's disease by attenuating mitochondrial dysfunction. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2014 Dec;127:101-10. doi: 10.1016/j.pbb.2014.11.002. PubMed PMID: 25449356.
43. Gaur V, Aggarwal A, Kumar A. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain. *European journal of*

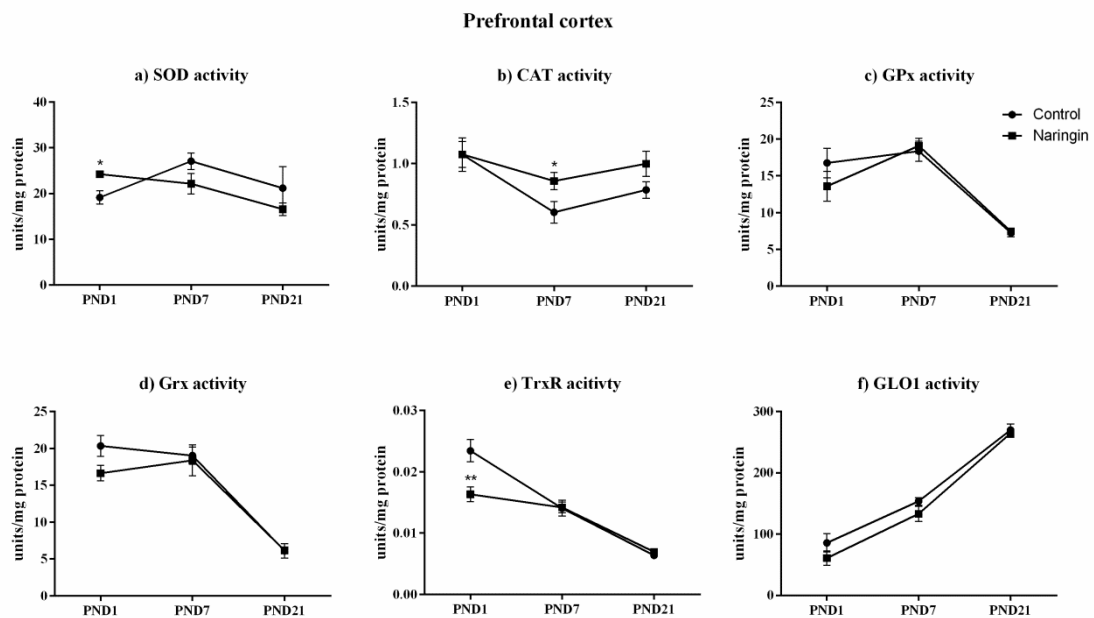
- pharmacology. 2009 Aug 15;616(1-3):147-54. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.056. PubMed PMID: 19577560.
44. Chtourou Y, Fetoui H, Gdoura R. Protective effects of naringenin on iron-overload-induced cerebral cortex neurotoxicity correlated with oxidative stress. *Biological trace element research*. 2014 Jun;158(3):376-83. doi: 10.1007/s12011-014-9948-0. PubMed PMID: 24682942.
  45. Hodkova A, Cerna P, Kotyzova D, et al. The effect of iron(III) on the activity of selenoenzymes and oxidative damage in the liver of rats. Interaction with natural antioxidants and deferiprone. *Hemoglobin*. 2010 Jun;34(3):278-83. doi: 10.3109/03630269.2010.485091. PubMed PMID: 20524817.
  46. Rathi VK, Das S, Parampalli Raghavendra A, et al. Naringin abates adverse effects of cadmium-mediated hepatotoxicity: An experimental study using HepG2 cells. *Journal of biochemical and molecular toxicology*. 2017 Aug;31(8). doi: 10.1002/jbt.21915. PubMed PMID: 28422390.
  47. Tarpey MM, Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Circulation research*. 2001 Aug 3;89(3):224-36. PubMed PMID: 11485972.
  48. Chtourou Y, Gargouri B, Kebieche M, et al. Naringin Abrogates Cisplatin-Induced Cognitive Deficits and Cholinergic Dysfunction Through the Down-Regulation of AChE Expression and iNOS Signaling Pathways in Hippocampus of Aged Rats. *Journal of molecular neuroscience : MN*. 2015 Jun;56(2):349-62. doi: 10.1007/s12031-015-0547-0. PubMed PMID: 25896911.
  49. Wang D, Yan J, Chen J, et al. Naringin Improves Neuronal Insulin Signaling, Brain Mitochondrial Function, and Cognitive Function in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Cellular and molecular neurobiology*. 2015 Oct;35(7):1061-71. doi: 10.1007/s10571-015-0201-y. PubMed PMID: 25939427.
  50. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Fifth edition. ed. Oxford, United Kingdom : Oxford University Press; 2015.
  51. Manchope MF, Calixto-Campos C, Coelho-Silva L, et al. Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATP Channel Signaling Pathway. *PLoS one*. 2016;11(4):e0153015. doi: 10.1371/journal.pone.0153015. PubMed PMID: 27045367; PubMed Central PMCID: PMC4821586.
  52. Ramakrishnan A, Vijayakumar N, Renuka M. Naringin regulates glutamate-nitric oxide cGMP pathway in ammonium chloride induced neurotoxicity. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2016 Dec;84:1717-1726. doi: 10.1016/j.biopha.2016.10.080. PubMed PMID: 27836465.
  53. de Oliveira MR, Brasil FB, Andrade CMB. Naringenin Attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Mitochondrial Dysfunction by an Nrf2-Dependent Mechanism in SH-SY5Y Cells. *Neurochemical research*. 2017 Nov;42(11):3341-3350. doi: 10.1007/s11064-017-2376-8. PubMed PMID: 28786049.
  54. Gopinath K, Sudhandiran G. Naringin modulates oxidative stress and inflammation in 3-nitropropionic acid-induced neurodegeneration through

- the activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 signalling pathway. *Neuroscience*. 2012 Dec 27;227:134-43. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.07.060. PubMed PMID: 22871521.
55. Berndt C, Lillig CH, Holmgren A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2007 Mar;292(3):H1227-36. doi: 10.1152/ajpheart.01162.2006. PubMed PMID: 17172268.
  56. Kulasekaran G, Ganapasam S. Neuroprotective efficacy of naringin on 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial dysfunction through the modulation of Nrf2 signaling pathway in PC12 cells. *Molecular and cellular biochemistry*. 2015 Nov;409(1-2):199-211. doi: 10.1007/s11010-015-2525-9. PubMed PMID: 26280522.
  57. Viswanatha GL, Shylaja H, Rao KS, et al. Amelioration of immobilization stress-induced biochemical and behavioral alterations and mitochondrial dysfunction by naringin in mice: possible mechanism of nitric oxide modulation. *Zhong xi yi jie he xue bao = Journal of Chinese integrative medicine*. 2011 Nov;9(11):1254-63. PubMed PMID: 22088593.
  58. Sachdeva AK, Chopra K. Naringin mitigate okadaic acid-induced cognitive impairment in an experimental paradigm of Alzheimer's disease. *Journal of Functional Foods*. 2015 2015/12/01/;19:110-125. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.08.024>.
  59. Rice D, Barone S, Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental health perspectives*. 2000 Jun;108 Suppl 3:511-33. PubMed PMID: 10852851; PubMed Central PMCID: PMC1637807.
  60. Bayer SA, Altman J, Russo RJ, et al. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*. 1993 Spring;14(1):83-144. PubMed PMID: 8361683.
  61. Bekkedal MY, Arfsten D, Mattie D. An evaluation of neurobehavioral tests used to assess the neurodevelopmental effects of early ammonium perchlorate exposure. *Journal of toxicology and environmental health Part A*. 2004 Apr 23-May 28;67(8-10):835-44. doi: 10.1080/15287390490428297. PubMed PMID: 15192872.
  62. Espin JC, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan FA. Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*. 2007 Nov-Dec;68(22-24):2986-3008. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.09.014. PubMed PMID: 17976666.

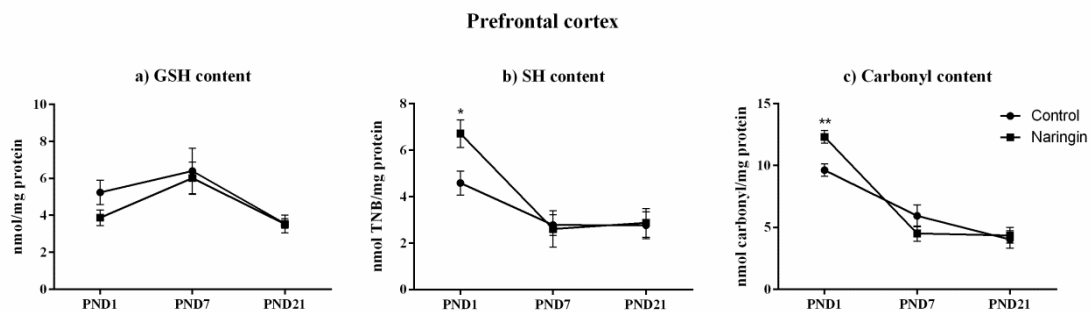
## Figure captions



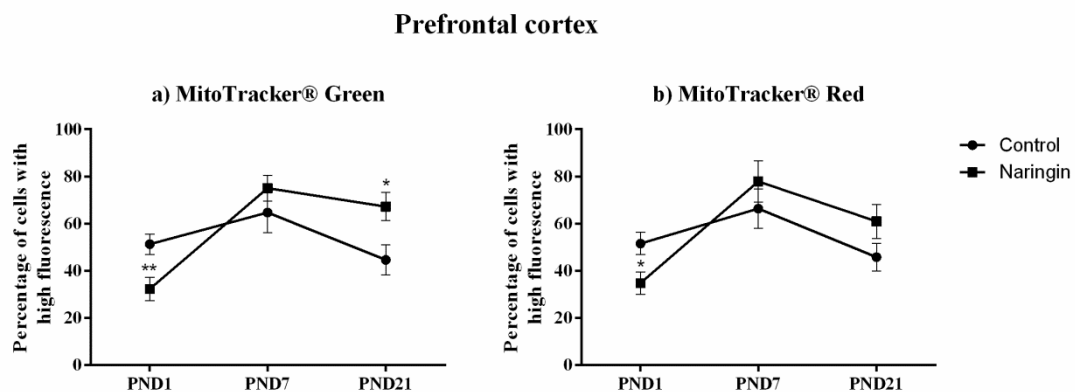
**Figure 1.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) DCFH oxidation, (b) mitochondrial superoxide content, and (c) nitric oxide content in offspring's prefrontal cortex on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=12-16. \* $p < 0.05$  (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day; DAF-FM: 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; DCFH: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate.



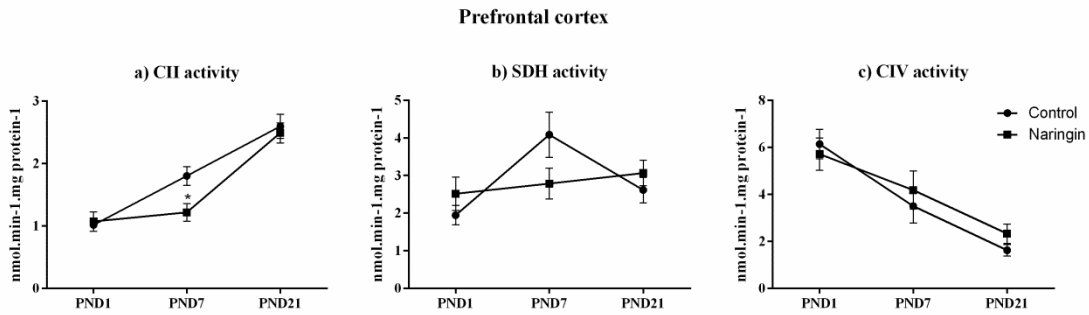
**Figure 2.** Effects of maternal naringin supplementation on activities of: (a) superoxide dismutase (SOD), (b) catalase (CAT), (c) glutathione-peroxidase (GPx), (d) glutaredoxin (Grx), (e) thioredoxin-reductase (TrxR), and (f) glyoxalase 1 (GLO1) in offspring prefrontal cortex on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=5-8. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



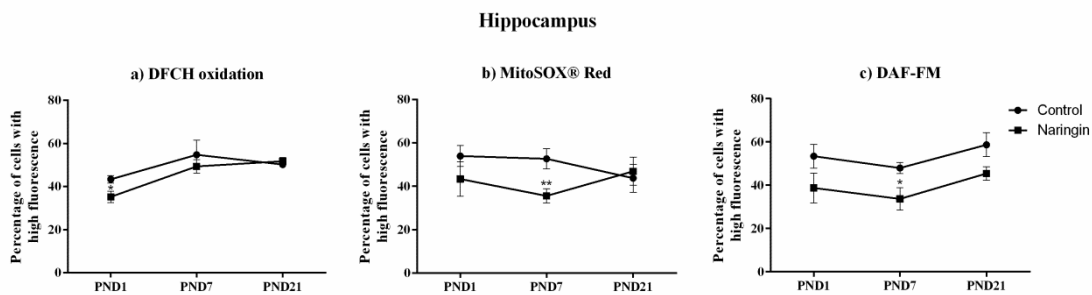
**Figure 3.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) reduced glutathione (GSH) content, (b) total thiol (SH) content, and (c) protein carbonyl content in offspring prefrontal cortex on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=5-8. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



**Figure 4.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) mitochondrial mass and (b) mitochondrial membrane potential in offspring prefrontal cortex on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=12-16. \*p<0.05; \*\*p<0.01 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



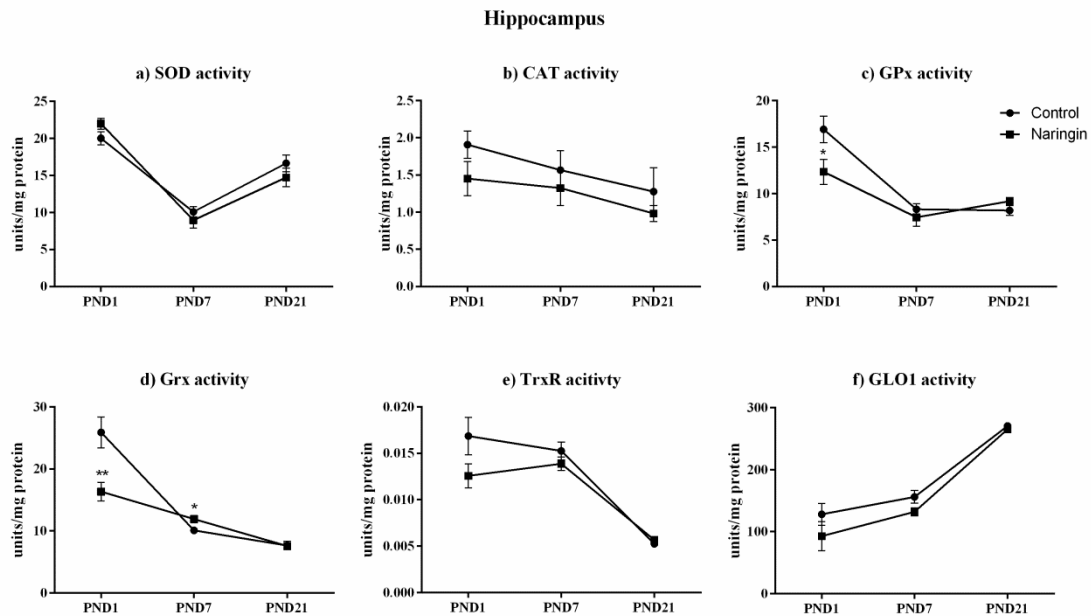
**Figure 5.** Effects of maternal naringin supplementation on activities of: (a) complex II (CII), (b) succinate dehydrogenase (SDH), and (c) complex IV (CIV) in offspring prefrontal cortex on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=5-8. \*p<0.05 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



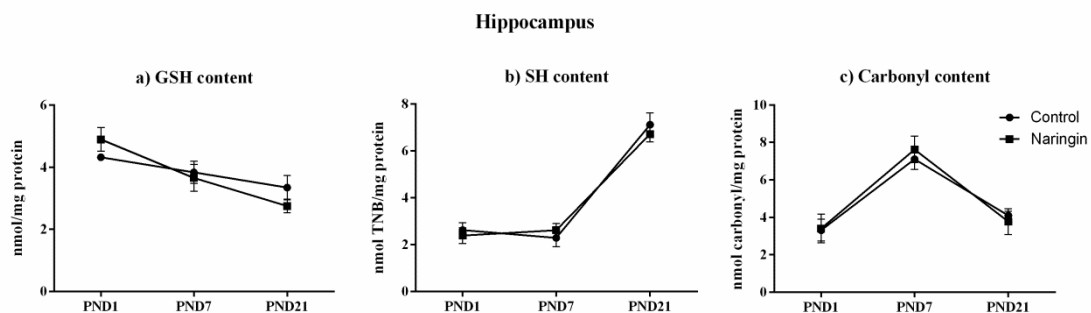
**Figure 6.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) DCFH oxidation, (b) mitochondrial superoxide content, and (c) nitric oxide content in offspring hippocampus on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=12-16. \*p<0.05; \*\*p<0.01 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day;



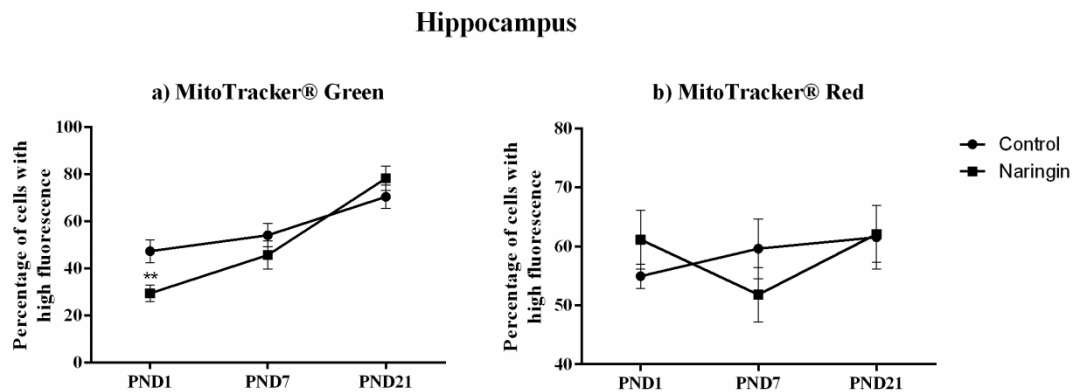
DAF-FM: 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; DCFH: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate.



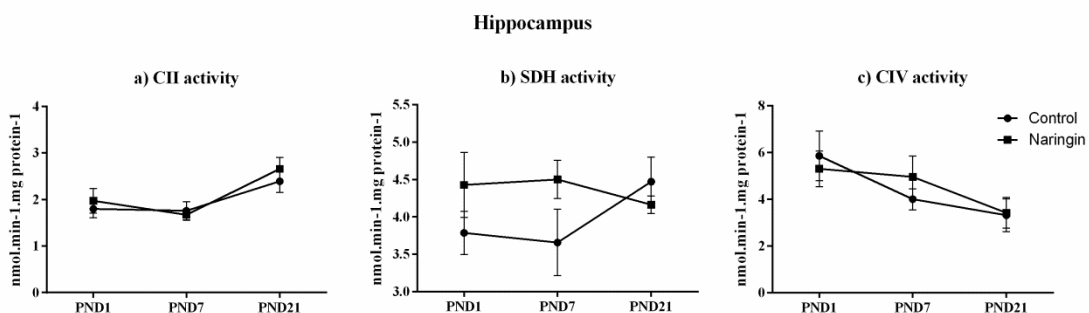
**Figure 7.** Effects of maternal naringin supplementation on activities of: (a) superoxide dismutase (SOD), (b) catalase (CAT), (c) glutathione-peroxidase (GPx), (d) glutaredoxin (Grx), (e) thioredoxin-reductase (TrxR), and (f) glyoxalase 1 (GLO1) in offspring hippocampus on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=5-8. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01 (Student's  $t$  test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



**Figure 8.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) reduced glutathione (GSH) content, (b) total thiol (SH) content, and (c) protein carbonyl content in offspring hippocampus on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=5-8. (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.

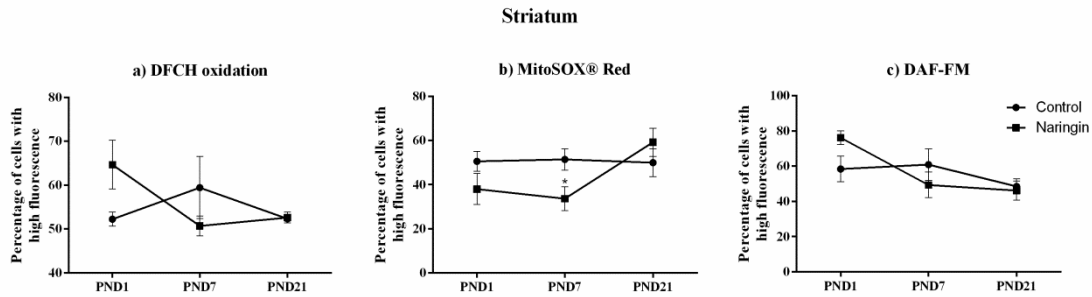


**Figure 9.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) mitochondrial mass and (b) mitochondrial membrane potential in offspring hippocampus on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=12-16. \*\* $p < 0.01$  (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.

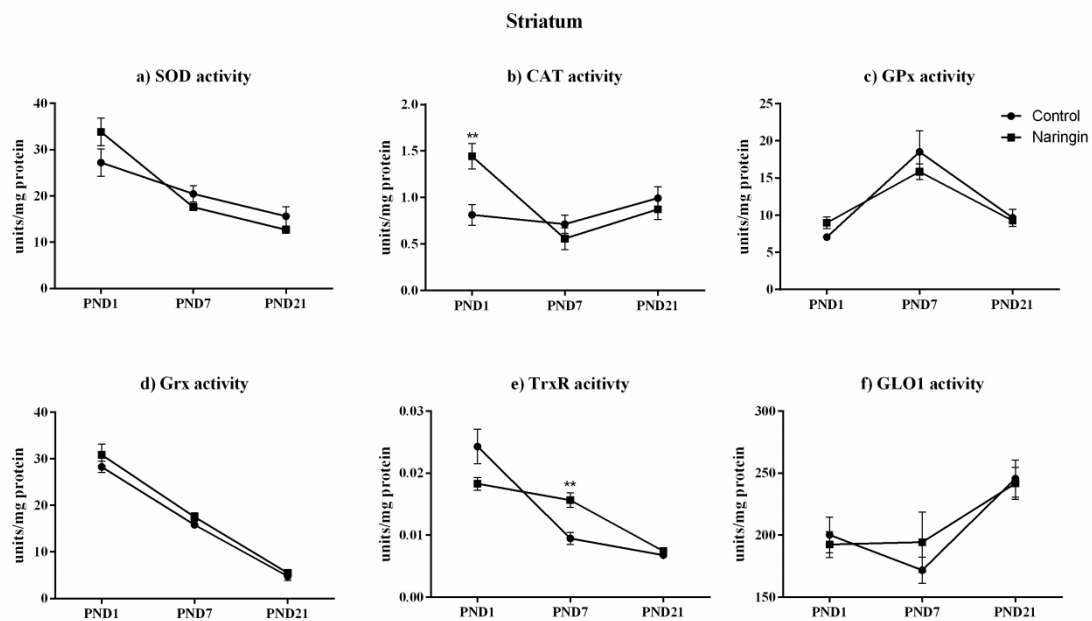


**Figure 10.** Effects of maternal naringin supplementation on activities of: (a) complex II (CII), (b) succinate dehydrogenase (SDH), and (c) complex IV (CIV) in offspring

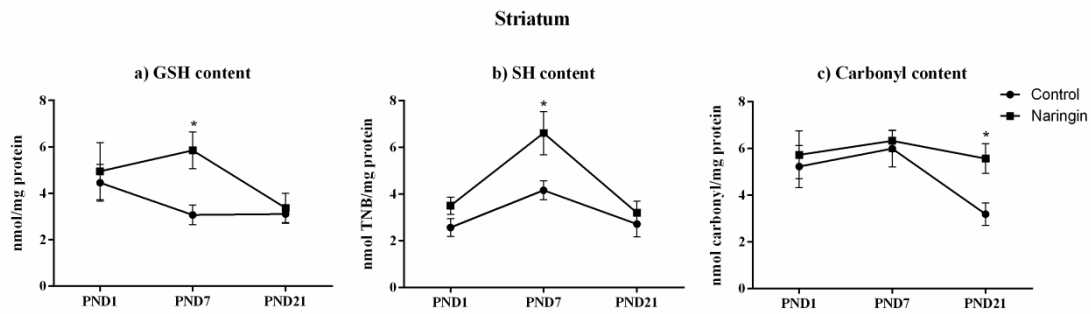
hippocampus on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=5-8 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



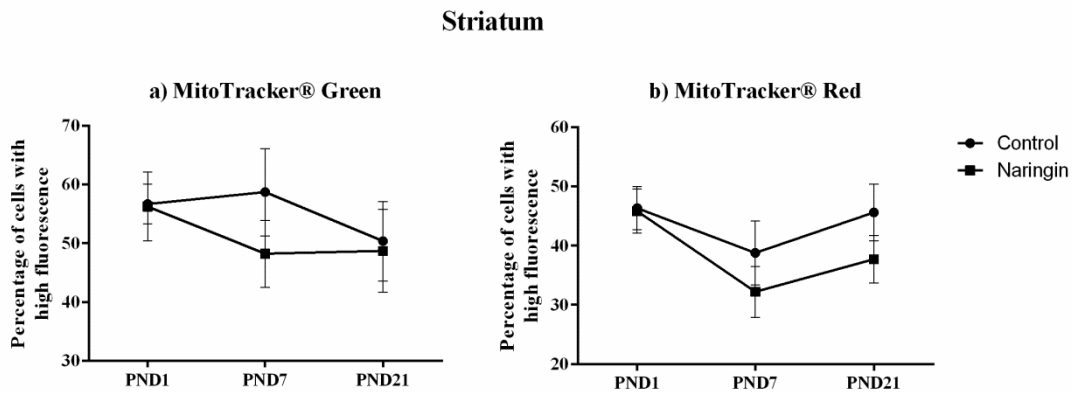
**Figure 11.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) DCFH oxidation, (b) mitochondrial superoxide content, and (c) nitric oxide content in offspring striatum on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=12-16. \* $p < 0.05$  (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day; DAF-FM: 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; DCFH: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate.



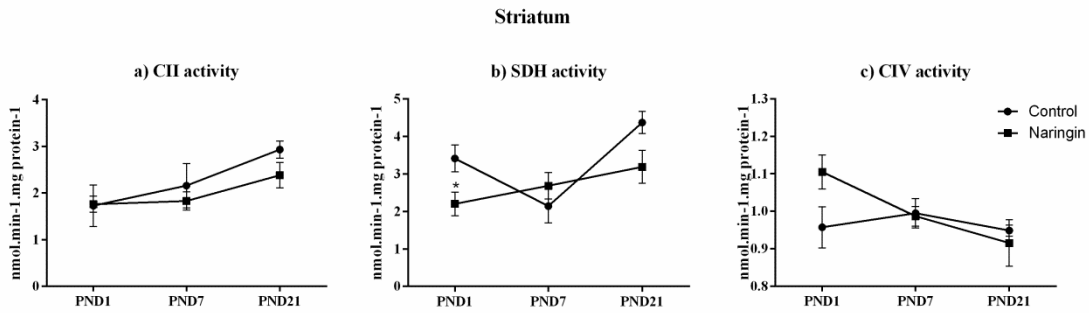
**Figure 12.** Effects of maternal naringin supplementation on activities of: (a) superoxide dismutase (SOD), (b) catalase (CAT), (c) glutathione-peroxidase (GPx), (d) glutaredoxin (Grx), (e) thioredoxin-reductase (TrxR), and (f) glyoxalase 1 (GLO1) in offspring striatum on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=5-8. \*\*p<0.01 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



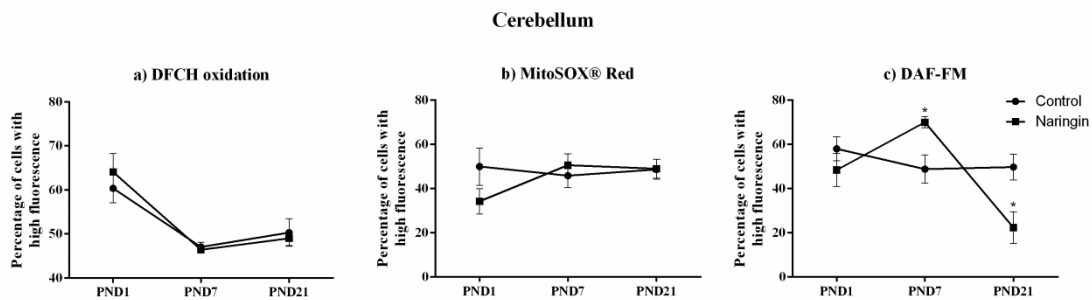
**Figure 13.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) reduced glutathione (GSH) content, (b) total thiol (SH) content, and (c) protein carbonyl content in offspring striatum on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=5-8. \*p<0.05 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



**Figure 14.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) mitochondrial mass and (b) mitochondrial membrane potential in offspring striatum on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=12-16 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.

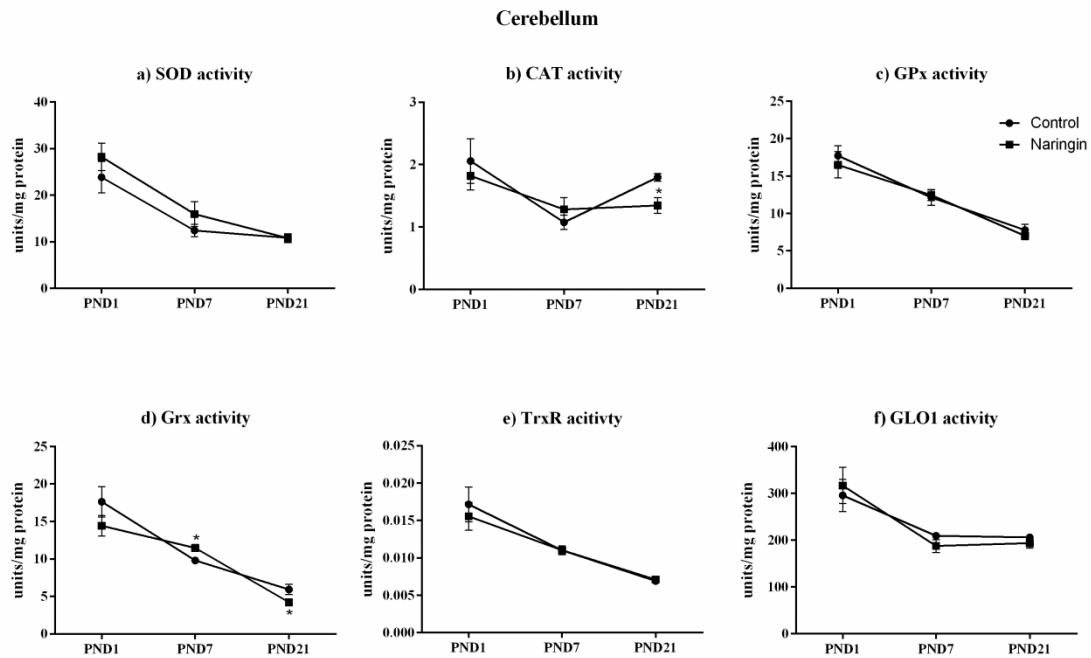


**Figure 15.** Effects of maternal naringin supplementation on activities of: (a) complex II (CII), (b) succinate dehydrogenase (SDH), and (c) complex IV (CIV) in offspring striatum on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=5-8. \**p*<0.05 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.

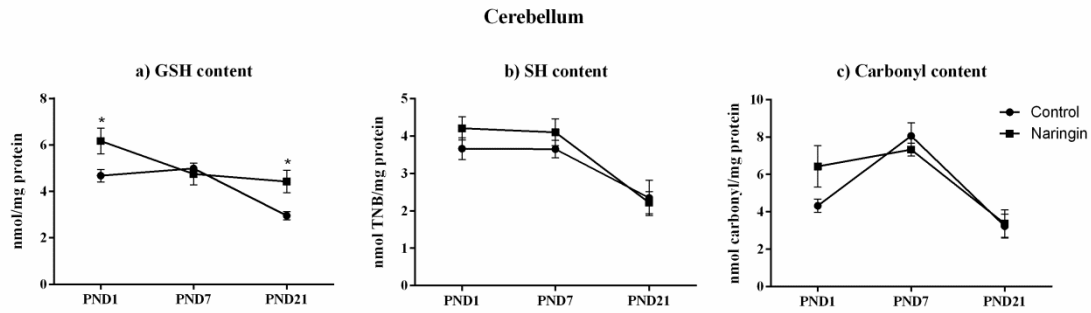


**Figure 16.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) DCFH oxidation, (b) mitochondrial superoxide content, and (c) nitric oxide content in offspring cerebellum on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=12-16. \**p*<0.05 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day; DAF-FM: 4-

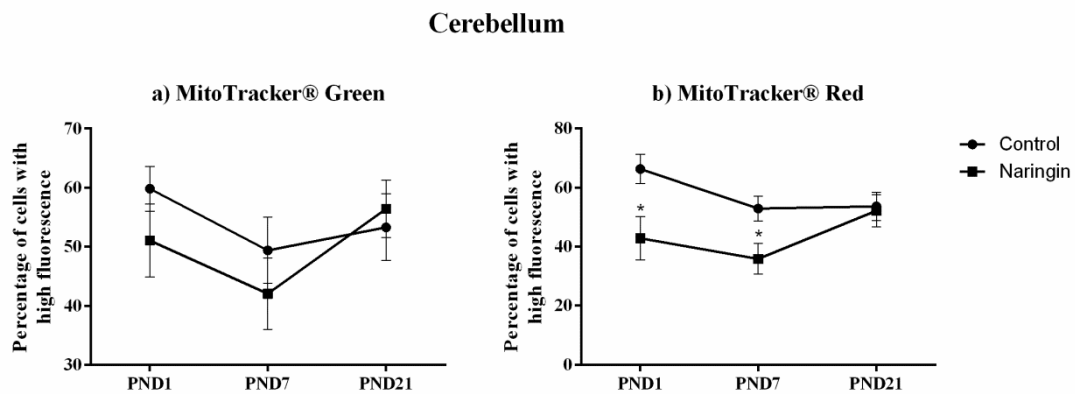
amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; DCFH: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate.



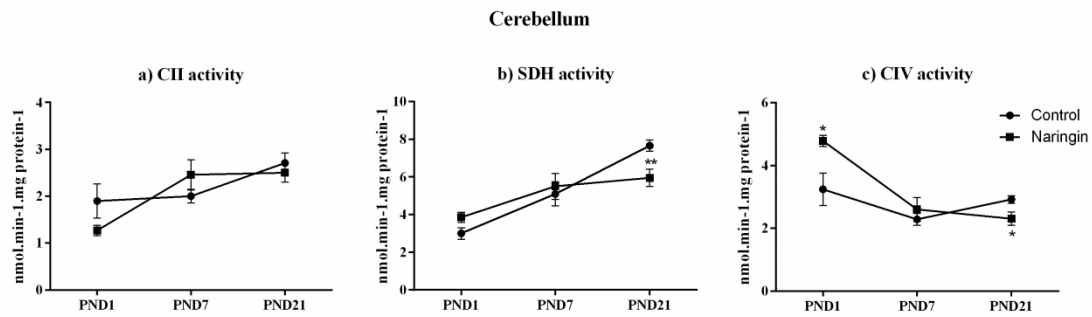
**Figure 17.** Effects of maternal naringin supplementation on activities of: (a) superoxide dismutase (SOD), (b) catalase (CAT), (c) glutathione-peroxidase (GPx), (d) glutaredoxin (Grx), (e) thioredoxin-reductase (TrxR), and (f) glyoxalase 1 (GLO1) in offspring cerebellum on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=5-8. \* $p < 0.05$  (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



**Figure 18.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) reduced glutathione (GSH) content, (b) total thiol (SH) content, and (c) protein carbonyl content in offspring cerebellum on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for  $n=5-8$ . \* $p<0.05$  (Student's  $t$  test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



**Figure 19.** Effects of maternal naringin supplementation on (a) mitochondrial mass and (b) mitochondrial membrane potential in offspring cerebellum on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for  $n=12-16$ . \* $p<0.05$  (Student's  $t$  test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



**Figure 20.** Effects of maternal naringin supplementation on activities of: (a) complex II (CII), (b) succinate dehydrogenase (SDH), and (c) complex IV (CIV) in offspring cerebellum on PND1, PND7, and PND21. Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for n=5-8. \*p<0.05; \*\*p<0.01 (Student's *t* test or Mann Whitney U test). PND: postnatal day.



#### 4. Discussão

A naringina é um flavonoide glicosilado predominantemente encontrado em frutas cítricas como o limão, a laranja e a toranja (SPENCER, 2008). Devido à sua capacidade de exercer efeitos neuroprotetores, a naringina tem sido amplamente estudada em diversos modelos animais de disfunção cognitiva e doenças neurodegenerativas como uma potencial abordagem farmacológica/nutricional com o objetivo de melhorar a saúde cognitiva (SPENCER, 2008; BHARTI *et al.*, 2014; JUNG *et al.*, 2014). No entanto, apesar do crescente interesse em utilizar a naringina para tratar tais condições, ainda não existem dados relacionados ao possível impacto dessa suplementação durante a gravidez sobre o desenvolvimento fetal, especialmente no SNC, o que pode interferir no uso da naringina como um suplemento. Dessa forma, em nosso trabalho, buscamos investigar os efeitos da suplementação com naringina durante a gestação sobre a homeostase redox e a função mitocondrial no córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado e cerebelo de filhotes fêmeas, além do desenvolvimento pós-natal e função mnemônica em filhotes machos.

Nossos resultados relacionados à avaliação pós-natal e comportamental dos filhotes machos demonstraram que o tratamento materno com naringina durante a gestação não alterou a grande maioria dos parâmetros analisados. No entanto, no teste de endireitamento de superfície, obtivemos um resultado estatisticamente significativo no DPN2, revelando que os filhotes nascidos de mães suplementadas com naringina levaram mais tempo para executar o teste nesse dia quando comparados com os filhotes controle, o que poderia indicar um déficit no desenvolvimento das estruturas relacionadas à percepção e

orientação do corpo (GALLAHUE, 2013; PAPALIA, 2013). Entretanto, no decorrer dos outros dias em que o teste foi realizado, não observamos nenhuma alteração, nem mesmo na média do dia em que os filhotes começaram a manifestar o reflexo de endireitamento de superfície.

Nossos achados demonstraram que a homeostase redox e a função mitocondrial do córtex pré-frontal foram alteradas pelo tratamento com naringina durante a gestação no DPN1. Nós observamos aumento da oxidação do DAF-FM através da citometria de fluxo, o que indica o aumento do conteúdo de óxido nítrico, no entanto, não foram observadas alterações no conteúdo de superóxido mitocondrial ou no conteúdo total de oxidantes. Corroborando com nossos resultados, foram observados em outros trabalhos aumento do conteúdo de óxido nítrico em cardiomiócitos de ratos neonatos em um modelo de apoptose induzido por estresse, bem como em cultura de tecido de aorta de ratos diabéticos com 6 – 7 semanas de idade, tratados com baicalina e quercetina, respectivamente (SHEN *et al.*, 2014; KUNASEGARAN *et al.*, 2016).

Além disso, não encontramos alterações nas atividades das enzimas antioxidantes CAT, GPx, Grx e GLO1 no DPN1 em córtex pré-frontal. No entanto, a atividade de SOD estava aumentada, concomitantemente com uma diminuição da atividade de TrxR. Esse mesmo resultado foi observado na atividade da SOD em córtex pré-frontal em um modelo de disfunção neurológica induzida por D-galactose em ratos tratados com naringina, bem como em ratos recém-nascidos submetidos a um modelo de toxicidade induzida por álcool e tratados com resveratrol (KUMAR *et al.*, 2010; TIWARI e CHOPRA, 2011; ZHANG *et al.*, 2017). Além disso, HODKOVA *et al.* (2010)

observaram uma redução da atividade da TrxR em fígado de ratos tratados com quercetina em um modelo de toxicidade induzida por ferro (III).

Curiosamente, também observamos níveis aumentados do conteúdo de carbonilas e tióis totais, apesar do conteúdo de GSH ter se mantido inalterado no córtex pré-frontal. Também foram observados níveis aumentados de grupos SH no córtex cerebral de ratos Wistar adultos tratados com naringina em um modelo de neurotoxicidade induzida por ferro, bem como em um modelo de toxicidade induzida pelo cádmio em cultura de células HepG2, no qual as células também foram tratadas com naringina (CHTOUROU *et al.*, 2014; RATHI *et al.*, 2017). Além disso, em contraste com nossos achados, o tratamento com 50 e 100 mg/kg de naringina diminuiu os níveis de carbonilas no hipocampo de ratos Wistar em um modelo de déficit cognitivo induzido por cisplatina (CHTOUROU *et al.*, 2015b). Outros trabalhos que utilizaram modelos animais também demonstraram o mesmo padrão quanto ao conteúdo de carbonilas no homogeneizado de tecido cerebral total, no entanto, utilizando outros polifenóis (NASEEM e PARVEZ, 2014; GONG *et al.*, 2015).

Além disso, também observamos a massa e potencial de membrana mitocondrial reduzidos no DPN1 em córtex pré-frontal de filhotes nascidos de ratas prenhas suplementadas com naringina. Em contraste com nossos achados, o aumento da integridade e do potencial de membrana mitocondrial foram observados em um modelo de hipóxia-isquemia em ratos neonatos tratados com resveratrol (ARTEAGA *et al.*, 2015). Além disso, MEIRA MARTINS *et al.* (2015) observaram aumento da massa mitocondrial, embora o potencial de membrana tenha permanecido inalterado em células hepáticas estreladas ativas que foram tratadas com resveratrol.

Não foram observadas alterações no nível total de oxidantes no córtex pré-frontal no DPN7, bem como na maioria das enzimas antioxidantes, exceto a atividade da CAT, que estava aumentada nessa idade. Também não foi observada nenhuma alteração no conteúdo de GSH, tióis totais e de carbonilas, e as alterações na massa e no potencial de membrana mitocondriais observadas no DPN1 não persistiram até aqui. No entanto, no DPN7, encontramos atividade reduzida do CII, porém sem alterações nas atividades da SDH e do CIV. Outros trabalhos também observaram aumento da atividade de CAT no córtex cerebral de ratos adultos submetidos a um modelo de hipóxia-isquemia e tratados com naringina, bem como no homogeneizado de cérebro total de ratos submetidos a um modelo de depressão pós-acidente vascular cerebral (GAUR *et al.*, 2009; AGGARWAL *et al.*, 2010). Além disso, também foi observado o aumento da atividade do CII por GAUR *et al.* (2009) no córtex cerebral de ratos Wistar adultos tratados com naringina e submetidos a um modelo de isquemia-reperfusão.

Ademais, no DPN21 não observamos mudanças significativas como as encontradas no DPN1. As filhotes nascidas de mães tratadas com naringina durante a prenhez apresentaram aumento da massa mitocondrial quando comparados com filhotes controle. Este achado é o oposto do resultado observado no DPN1 e corrobora com outros dados como o de ARTEAGA *et al.* (2015) que também encontraram aumento da massa mitocondrial em ratos recém-nascidos tratados com resveratrol, em um modelo de hipóxia-isquemia.

No hipocampo de filhotes expostos à naringina observamos uma diminuição dos níveis totais de oxidantes no DPN1. Esse resultado corrobora com outros trabalhos que demonstraram a diminuição do conteúdo total de oxidantes no

hipocampo, também avaliado através da oxidação do DCFH, em ratos Wistar adultos tratados com naringina 50 e 100 mg/kg em um modelo de déficits cognitivos induzidos por cisplatina, bem como em ratos tratados com naringina em um modelo de déficits cognitivos induzidos pela obesidade (CHTOUROU *et al.*, 2015b; WANG *et al.*, 2015). Além disso, ARTEAGA *et al.* (2015) observaram que o pré-tratamento com resveratrol impediu o aumento do conteúdo de DCFH no cérebro de ratos neonatos Sprague-Dawley em 3 e 12 horas após induzida a hipóxia-isquemia.

Em relação às enzimas antioxidantes, encontramos uma diminuição das atividades da GPx e Grx no hipocampo de filhotes naringina. A redução da atividade da GPx também foi observada em homogeneizado de cérebro total de ratos adultos tratados com hesperidina em um modelo de neurotoxicidade (NASEEM e PARVEZ, 2014). Além disso, o tratamento de 8 e 20 mg/kg de naringina também reduziu a atividade de GPx em testículos de ratos após duas semanas de tratamento intraperitoneal (RANAWAT e BAKSHI, 2017). No entanto, em contraste com nosso resultado e os resultados citados acima, o tratamento com 100 mg/kg de naringina aumentou a atividade de GPx no hipocampo de ratos em um modelo de disfunção neural induzido por deltametrina (MANI, 2014).

Além disso, também encontramos uma diminuição da massa mitocondrial no hipocampo de filhotes nascidos de mães tratadas com naringina durante a prenhez no DPN1, no entanto, não foram observadas alterações no potencial de membrana mitocondrial. MEIRA MARTINS *et al.* (2015) observaram o aumento da fluorescência do MitoTracker<sup>®</sup> Green, o que indicou um aumento da massa mitocondrial em células hepáticas estreladas ativadas que foram

tratadas com 1, 10 e 50 uM de resveratrol. Do mesmo modo, o aumento da massa mitocondrial foi observado por (ARTEAGA *et al.*, 2015) em ratos neonatos tratados com resveratrol em um modelo de hipoxia-isquemia.

Ainda, no DPN7, observamos uma redução do conteúdo de óxido nítrico e superóxido mitocondrial, apesar de não ter sido encontrada nenhuma alteração nos níveis totais de oxidantes. Deste modo, outros trabalhos demonstraram que o tratamento com 80 mg/kg de naringina também reduziu os níveis de óxido nítrico em homogeneizado de cérebro total de ratos Wistar adultos em um modelo de neurotoxicidade induzido por cloreto de amônio (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2016). Da mesma forma, o tratamento com 50 mg/kg de naringenina foi capaz de reduzir o conteúdo de ânion superóxido na pele da pata de camundongos em um modelo de dor crônica (MANCHOPE *et al.*, 2016). Além disso, um aumento da atividade da Grx foi observado no DPN7, em contraste com o resultado do DPN1.

No DPN1, nenhum dos oxidantes foi encontrado alterado no corpo estriado da prole de mãe suplementadas com naringina. Além do mais, a atividade da CAT estava aumentada nesta idade, apesar de não terem sido encontradas nenhuma alteração na atividade das outras enzimas antioxidantes. O aumento da atividade da CAT também foi observado em cérebro total de camundongos tratados com 100 mg/kg de naringina em um modelo de estresse induzido pela imobilização forçada (VISWANATHA *et al.*, 2011). Essa alteração na atividade da CAT também foi observada no corpo estriado de ratos adultos tratados com rutina em um modelo de alterações bioquímicas induzidas por ácido 3-nitropropiónico (SUGANYA e SUMATHI, 2017).

Além do mais, não foram detectadas alterações na massa e no potencial de membrana mitocondrial no corpo estriado no DPN1. No entanto, observamos a redução da atividade da SDH, porém sem alteração nas atividades do CII e CIV. SAHU *et al.* (2014) não observaram alterações na atividade de SDH em rim de ratos tratados com 50 mg/kg de naringina, em um modelo de toxicidade renal, porém, o tratamento com 100 mg/kg de naringina foi capaz de aumentar a atividade SDH. Do mesmo modo, o tratamento com hesperidina e curcumina aumentou a atividade de SDH em cérebro total de ratos em um modelo de disfunção cognitiva (BANJI *et al.*, 2014).

Ja no DPN7 foram encontrados níveis reduzidos do conteúdo de superóxido mitocondrial no corpo estriado de filhotes. Esse mesmo resultado também foi encontrado na pele da pata de ratos tratados como naringenina, em um modelo de inflamação induzida por LPS (PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2016). Ademais, o tratamento com naringenina na dose de 80 µM impediu o aumento de superóxido em células SH-SY5Y, em um modelo de disfunção mitocondrial induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e o tratamento com quercetina 0,1 µM também reduziu o conteúdo de superóxido em células cultivadas de aorta de ratos neonatos (KUNASEGARAN *et al.*, 2016; DE OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Além do conteúdo reduzido de superóxido mitocondrial, observamos um aumento da atividade de TrxR no corpo estriado no DPN7. Corroborando com nossos resultados, HODKOVA *et al.* (2010) o tratamento com naringina aumentou a atividade de TrxR no fígado de ratos Wistar adultos. Assim, juntamente com o aumento da atividade de TrxR, também observamos aumento de GSH e de tióis total. Por conseguinte, o tratamento com 50, 80 e 100 mg/kg de naringina aumentaram o conteúdo de GSH no corpo estriado de

ratos Wistar adultos, em modelos de disfunção cognitiva induzida quimicamente (GOPINATH e SUDHANDIRAN, 2012). Ademais, o tratamento com 50 mg/kg de naringina aumentou o conteúdo de tióis totais no córtex de ratos submetidos a um modelo toxicidade induzido por ferro (CHTOUROU *et al.*, 2014). Já no DPN 21, detectamos aumento nos níveis de carbonilas em filhotes em filhotes nascidos de ratas suplementadas durante a prenhez. Em contraste, o tratamento com naringina e quercetina reduziu o conteúdo de carbonilas no corpo estriado de ratos adultos em diferentes modelos de neurotoxicidade (HALEAGRAHARA *et al.*, 2011; HALEAGRAHARA *et al.*, 2013; CHTOUROU *et al.*, 2015a).

No DPN1, os filhotes nascidos de mães tratadas com naringina demonstraram aumento do conteúdo de GSH no cerebelo. Conseqüentemente, o tratamento com 20, 40 e 80 mg/kg de naringina aumentaram o conteúdo de GSH no cérebro total de ratos Wistar adultos, em um modelo de convulsões (GOLECHHA *et al.*, 2014). Além do mais, a administração de um extrato rico em polifenóis da folha de mirtilo, foi capaz de aumentar os níveis de GSH no cerebelo de ratos Wistar neonatos, em um modelo de toxicidade induzida quimicamente (FERLEMI *et al.*, 2015).

Além disso, também demonstramos uma redução do potencial de membrana mitocondrial, juntamente com o aumento da atividade do CIV no cerebelo dos filhotes no DPN1. Em contraste com os nossos resultados, o tratamento com naringina aumentou o potencial de membrana mitocondrial no hipocampo de camundongos e em células PC12, em diferentes modelos de toxicidade (KULASEKARAN e GANAPASAM, 2015; WANG *et al.*, 2015). Ademais, a atividade de CIV foi aumentada após o tratamento com naringina,



em modelos de toxicidade cardíaca e cerebral, em roedores (GAUR *et al.*, 2009; KUMAR e KUMAR, 2010; ADIL *et al.*, 2016a).

No DPN7, encontramos conteúdo elevado de óxido nítrico, mas sem alterações nos níveis totais de oxidantes e no conteúdo de superóxido mitocondrial. Desse modo, o tratamento com quercetina e baicalina aumentou os níveis de óxido nítrico em células da aorta e cardiomiócitos cultivados de ratos neonatos (SHEN *et al.*, 2014; KUNASEGARAN *et al.*, 2016). O tratamento com epicatequina 100 nM também foi capaz de induzir um aumento nos níveis de óxido nítrico das células endoteliais da artéria coronária humana (RAMIREZ-SANCHEZ *et al.*, 2010; MORENO-ULLOA *et al.*, 2014). Assim, de forma semelhante ao DPN1, também observamos diminuição do potencial de membrana mitocondrial no cerebelo de filhotes no DPN7, concomitante com o aumento da atividade de Grx.

Em contraste com os resultados encontrados no DPN7, observamos a redução do conteúdo de óxido nítrico, no cerebelo de filhotes naringina no DPN21. Outros trabalhos demonstraram que o tratamento com 50 mg/kg de naringina foi capaz de prevenir um aumento dos níveis de óxido nítrico nas vísceras de ratos Wistar adultos, em um modelo de isquemia-reperfusão (CERKEZKAYABEKIR *et al.*, 2017). ADIL *et al.* (2016b) também demonstraram que o tratamento com 40 e 80 mg/kg de naringina preveniu o aumento dos níveis de óxido nítrico no fígado e rins de ratos Wistar adultos, quando submetidos a um modelo de toxicidade induzida por acetaminofeno. Além disso, o tratamento com 80 mg/kg de naringina também reduziram o conteúdo de óxido nítrico em cérebro total de ratos adultos em um modelo de toxicidade induzida por cloreto de amônio (RAMAKRISHNAN *et al.*, 2016).

Já as análises das enzimas antioxidantes demonstraram que apenas as atividades da CAT e Grx estavam alteradas no DPN21. Ao contrário dos nossos resultados, alguns estudos demonstraram o aumento da atividade de CAT no cérebro total, no hipotálamo, no córtex e no músculo esquelético desencadeado pelo tratamento com naringina em diferentes modelos de doenças (VISWANATHA *et al.*, 2011; MANI, 2014; SACHDEVA *et al.*, 2014; GURSUL *et al.*, 2016; RAMAKRISHNAN *et al.*, 2016). No entanto, outros trabalhos também demonstraram que o tratamento com naringina ou naringenina foi capaz de reduzir a atividade de CAT no corpo estriado de ratos, assim como no córtex cerebral em modelos de toxicidade induzidos por cisplatina e ferro (CHTOUROU *et al.*, 2014; CHTOUROU *et al.*, 2015b). Do mesmo modo, o tratamento intraperitoneal com 8 e 20 mg/kg de naringenina por duas semanas também reduziu a atividade de CAT em testículos de camundongos machos (RANAWAT e BAKSHI, 2017).

Já o aumento do conteúdo de GSH encontrado em nosso trabalho também foi observado em outros estudos que analisaram pulmões, cérebro total, rins e fígado, tanto em ratos tratados com naringina, quanto com naringenina, em diferentes modelos de doenças ou toxicidade (GOLECHHA *et al.*, 2014; ADIL *et al.*, 2016a; ADIL *et al.*, 2016b; ALI *et al.*, 2017). VANHEES *et al.* (2013) demonstraram que a suplementação com 270 mg/kg de genisteína durante a gravidez aumentou o conteúdo de GSH no fígado da prole nascida de ratas suplementadas.

Além do que já foi mencionado anteriormente, também encontramos uma redução das atividades da SDH e CIV no DPN21 no cerebelo da prole nascida de ratas suplementadas com naringina durante a prenhez. Em contraste, o

tratamento com 80  $\mu\text{M}$  de naringenina aumentou a atividade da SDH em células SH-SY5Y, em um modelo de estresse oxidativo induzido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (DE OLIVEIRA *et al.*, 2017). Além disso, o tratamento com 50, 100 e 200 mg/kg de naringina aumentou a atividade do CIV no cérebro total, hipocampo, corpo estriado e córtex cerebral de ratos Wistar, em modelos de disfunção cognitiva induzidos por isquemia e ácido ocadaico (GAUR *et al.*, 2009; SACHDEVA *et al.*, 2014).

Além disso, alguns fatores precisam ser levados em consideração diante das alterações encontradas em nosso trabalho. Primeiramente, a gestação de ratos dura cerca de 21 dia, já a de humanos pode levar em torno de 270 dias (WORKMAN *et al.*, 2013). Portanto, devido a essa diferença, as idades pós-natal em que os cérebros da prole foram avaliados em nosso modelo correspondem a diferentes idades humano: filhotes de ratos recém-nascidos, entre DPN1 e DPN3, correspondem a um bebê humano entre 23 e 32 semanas de gestação, já um filhote de rato no DPN7 corresponde a um bebê humano recém-nascido. Além disso, um rato no DPN21 corresponde a uma criança que possui de 2 a 3 anos de idade (ANDERSEN, 2003; SEMPLE *et al.*, 2013; SENGUPTA, 2013).

Além disso, cada estrutura do cérebro avaliada aqui tem um tempo diferente de desenvolvimento durante os períodos pré-natal e/ou pós-natal. O córtex cerebral e o corpo estriado começam a se desenvolver em torno do dia gestacional 15 em ratos, terminando em torno do nascimento para o córtex pré-frontal. Nos humanos, por sua vez, esta janela corresponde às semanas gestacionais 7 a 19. Além disso, o desenvolvimento do hipocampo começa em torno do dia gestacional 14 em ratos (sétima semana de gestação em

humanos), com regiões CA1-3 e córtex entorrinal e continua após o nascimento, com o desenvolvimento das células do giro dentado. Além do mais, o desenvolvimento do cerebelo começa em torno do dia gestacional 11 em embriões de ratos, o que em seres humanos corresponde à quarta semana de gestação, e continuará após o nascimento até o DPN20, em ratos (BAYER *et al.*, 1993; RICE e BARONE, 2000; BEKKEDAL *et al.*, 2004; PAXINOS, 2004).

Assim, nossos resultados demonstraram que o cerebelo dos filhotes foi a estrutura mais afetada. Esse fato pode demonstrar uma maior susceptibilidade do cerebelo aos efeitos desencadeados pela suplementação com naringina quando comparado às outras estruturas cerebrais analisadas. Além disso, as alterações foram mais persistentes, uma vez que foram observadas até o DPN21, enquanto o hipocampo, o córtex pré-frontal e o corpo estriado demonstraram nenhuma ou apenas algumas alterações nesta idade. Especulamos, então, se isso pode acontecer devido ao período mais longo de desenvolvimento do cerebelo quando comparado às outras estruturas cerebrais analisadas em nosso trabalho.

Já em relação à dose de naringina que utilizamos, de 100 mg/kg/dia, em um humano de 70 kg corresponderia a aproximadamente 0,6 g/dia, baseado na comparação da área da superfície corporal entre humanos e ratos (REAGAN-SHAW *et al.*, 2008). Além disso, estima-se que o consumo de polifenóis na dieta humana seja aproximadamente 1 g/dia, de acordo com SCALBERT e WILLIAMSON (2000), embora a quantidade de flavanonas consumida em diferentes países pode variar bastante, entre 21 a 29,4 mg/dia na Alemanha, 31 a 78 mg/dia na Grécia, aproximadamente 31 mg/dia na Itália e 2,7 mg/dia nos

Estado Unidos (LINSEISEN *et al.*, 1997; RADTKE *et al.*, 2002; LAGIOU *et al.*, 2004a; LAGIOU *et al.*, 2004b; BOSETTI *et al.*, 2005; CHUN *et al.*, 2007; ERDMAN *et al.*, 2007). Assim, a partir desse ponto de vista, a dose utilizada no nosso modelo não alcança o que é obtido pela dieta através do consumo de frutas e vegetais. No entanto, suplementos de flavonoides, até mesmo de naringina, já estão disponíveis no mercado para venda, com doses recomendadas de 500 mg/dia a 1g/dia (ESPIN *et al.*, 2007).

## 5. Conclusões

Em nosso trabalho, buscamos avaliar os efeitos da suplementação com naringina durante a gestação sobre a homeostase redox, função mitocondrial no encéfalo de filhotes fêmeas e o desenvolvimento pós-natal nos filhotes machos. Nossos resultados demonstraram que tanto a homeostase redox quanto a função mitocondrial foram afetadas de uma forma específica em relação a estrutura e a idade avaliada, no entanto, os testes que avaliaram o desenvolvimento pós-natal em filhotes machos não demonstraram alterações significativas. Assim, podemos inferir que: (1) cada estrutura cerebral foi afetada de forma diferente; (2) as alterações também foram dependentes da idade avaliada; (3) o cerebelo foi a estrutura mais afetada, visto que demonstrou o maior número de alterações e também a maior persistência dessas alterações até idades mais avançadas; (4) córtex pré-frontal, hipocampo e estriado apresentaram uma redução progressiva na quantidade de alterações durante o desenvolvimento, indicando uma possível reversão dos efeitos causados pela exposição pré-natal a naringina; (5) a suplementação com naringina durante a prenhez não alterou significativamente o desenvolvimento neuromotor pós-natal em filhotes machos. Assim, fica evidente a necessidade de mais estudos que visem esclarecer os mecanismos responsáveis pelas diversas alterações bioquímicas encontradas. Além disso, nosso trabalho também demonstra que é preciso cautela no uso de suplementos que contenham naringina durante a gestação.

## 6. Perspectivas

As perspectivas do nosso trabalho são o esclarecimento dos prováveis mecanismos de sinalização celular e epigenéticos que levam as alterações bioquímicas que foram demonstradas nesta dissertação. Assim, iremos avaliar as vias de sinalização do Nrf2, TFAM, PPAR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , AKT, pAKT, bem como os marcadores de dinâmica mitocondrial, mitofusinas e DRP1, além das SIRT1, SIRT3 e marcadores de alterações epigenéticas como o imunociteúdo de DNMT1, HDAC3, 4, 5 e 9 H4K12 acetilada em córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado e cerebelo.

Além disso, também iremos expandir nossas análises para ambos os sexos dos filhotes, assim buscando esclarecer se os efeitos observados podem ser sexo-dependentes. Também incluiremos uma quarta idade, DPN60, em nossas análises, buscando assim investigar se os efeitos desencadeados pela suplementação com naringina durante a gestação podem persistir até a vida adulta na prole.

## Referências

ADIL, M.; KANDHARE, A. D.; GHOSH, P.; BODHANKAR, S. L. Sodium arsenite-induced myocardial bruise in rats: Ameliorative effect of naringin via TGF-beta/Smad and Nrf/HO pathways. **Chem Biol Interact**, v. 253, p. 66-77, Jun 25 2016a.

ADIL, M.; KANDHARE, A. D.; GHOSH, P.; VENKATA, S.; RAYGUDE, K. S.; BODHANKAR, S. L. Ameliorative effect of naringin in acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity in laboratory rats: role of FXR and KIM-1. **Ren Fail**, v. 38, n. 6, p. 1007-20, Jul 2016b.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984.

AGGARWAL, A.; GAUR, V.; KUMAR, A. Nitric oxide mechanism in the protective effect of naringin against post-stroke depression (PSD) in mice. **Life Sci**, v. 86, n. 25-26, p. 928-35, Jun 19 2010.

AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, Jan 2002.

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett**, v. 302, n. 2-3, p. 141-5, Apr 20 2001.

ALAM, M. A.; SUBHAN, N.; RAHMAN, M. M.; UDDIN, S. J.; REZA, H. M.; SARKER, S. D. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. **Adv Nutr**, v. 5, n. 4, p. 404-17, Jul 2014.

ALI, R.; SHAHID, A.; ALI, N.; HASAN, S. K.; MAJED, F.; SULTANA, S. Amelioration of Benzo[a]pyrene-induced oxidative stress and pulmonary toxicity by Naringenin in Wistar rats: A plausible role of COX-2 and NF-kappaB. **Hum Exp Toxicol**, v. 36, n. 4, p. 349-364, Apr 2017.

ALLAMAN, I.; BELANGER, M.; MAGISTRETTI, P. J. Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. **Front Neurosci**, v. 9, p. 23, 2015.

ANDERSEN, S. L. Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 1-2, p. 3-18, Jan-Mar 2003.



AOYAMA, K.; NAKAKI, T. Impaired glutathione synthesis in neurodegeneration. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 10, p. 21021-44, Oct 18 2013.

AOYAMA, K.; NAKAKI, T. Glutathione in Cellular Redox Homeostasis: Association with the Excitatory Amino Acid Carrier 1 (EAAC1). **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8742-58, 2015.

ARNER, E. S.; HOLMGREN, A. Measurement of thioredoxin and thioredoxin reductase. **Curr Protoc Toxicol**, v. Chapter 7, p. Unit 7 4, May 2001.

ARTEAGA, O.; REVUELTA, M.; URIGUEN, L.; ALVAREZ, A.; MONTALVO, H.; HILARIO, E. Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats. **PLoS One**, v. 10, n. 11, p. e0142424, 2015.

BALAN, B. J.; SKOPINSKA-ROZEWSKA, E.; SKOPINSKI, P.; ZDANOWSKI, R.; LESNIAK, M.; KIEPURA, A.; LEWICKI, S. Morphometric abnormalities in the spleen of the progeny of mice fed epigallocatechin during gestation and nursing. **Pol J Vet Sci**, v. 20, n. 1, p. 5-12, Mar 28 2017.

BANJI, O. J.; BANJI, D.; CH, K. Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain. **Food Chem Toxicol**, v. 74, p. 51-9, Dec 2014.

BAYER, S. A.; ALTMAN, J.; RUSSO, R. J.; ZHANG, X. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **Neurotoxicology**, v. 14, n. 1, p. 83-144, Spring 1993.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424-37, Nov 1996.

BEKKEDAL, M. Y.; ARFSTEN, D.; MATTIE, D. An evaluation of neurobehavioral tests used to assess the neurodevelopmental effects of early ammonium perchlorate exposure. **J Toxicol Environ Health A**, v. 67, n. 8-10, p. 835-44, Apr 23-May 28 2004.

BERNDT, C.; LILLIG, C. H.; HOLMGREN, A. Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 3, p. H1227-36, Mar 2007.

BHARTI, S.; RANI, N.; KRISHNAMURTHY, B.; ARYA, D. S. Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. **Planta Med**, v. 80, n. 6, p. 437-51, Apr 2014.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, n. 1, p. 9-19, Jan 2012.

BOSETTI, C.; SPERTINI, L.; PARPINEL, M.; GNAGNARELLA, P.; LAGIOU, P.; NEGRI, E.; FRANCESCHI, S.; MONTELLA, M.; PETERSON, J.; DWYER, J.; GIACOSA, A.; LA VECCHIA, C. Flavonoids and breast cancer risk in Italy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 4, p. 805-8, Apr 2005.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; MAIORINO, M. Glutathione peroxidases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 5, p. 3289-303, May 2013.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. Reduced glutathione and glutathione disulfide. **Methods Mol Biol**, v. 108, p. 347-52, 1998.

BUSCH, C.; BURKARD, M.; LEISCHNER, C.; LAUER, U. M.; FRANK, J.; VENTURELLI, S. Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. **Clin Epigenetics**, v. 7, p. 64, 2015.

CADENAS, E.; DAVIES, K. J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic Biol Med**, v. 29, n. 3-4, p. 222-30, Aug 2000.

CALVINO-NUNEZ, C.; DOMINGUEZ-DEL-TORO, E. Clonidine treatment delays postnatal motor development and blocks short-term memory in young mice. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114869, 2014.

CAROLAN-OLAH, M.; DUARTE-GARDEA, M.; LECHUGA, J. A critical review: early life nutrition and prenatal programming for adult disease. **J Clin Nurs**, Aug 9 2015.

CERKEZKAYABEKIR, A.; SANAL, F.; BAKAR, E.; ULUCAM, E.; INAN, M. Naringin protects viscera from ischemia/reperfusion injury by regulating the nitric oxide level in a rat model. **Biotech Histochem**, v. 92, n. 4, p. 252-263, 2017.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol Rev**, v. 59, n. 3, p. 527-605, Jul 1979.

CHEN, C.; TANG, Y.; JIANG, X.; QI, Y.; CHENG, S.; QIU, C.; PENG, B.; TU, B. Early postnatal benzo(a)pyrene exposure in Sprague-Dawley rats causes persistent neurobehavioral impairments that emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood. **Toxicol Sci**, v. 125, n. 1, p. 248-61, Jan 2012.

CHTOUROU, Y.; AOUEY, B.; KEBIECHE, M.; FETOUI, H. Protective role of naringin against cisplatin induced oxidative stress, inflammatory response and apoptosis in rat striatum via suppressing ROS-mediated NF-kappaB and P53 signaling pathways. **Chem Biol Interact**, v. 239, p. 76-86, Sep 05 2015a.

CHTOUROU, Y.; FETOUI, H.; GDOURA, R. Protective effects of naringenin on iron-overload-induced cerebral cortex neurotoxicity correlated with oxidative stress. **Biol Trace Elem Res**, v. 158, n. 3, p. 376-83, Jun 2014.

CHTOUROU, Y.; GARGOURI, B.; KEBIECHE, M.; FETOUI, H. Naringin Abrogates Cisplatin-Induced Cognitive Deficits and Cholinergic Dysfunction Through the Down-Regulation of AChE Expression and iNOS Signaling Pathways in Hippocampus of Aged Rats. **J Mol Neurosci**, v. 56, n. 2, p. 349-62, Jun 2015b.

CHTOUROU, Y.; SLIMA, A. B.; GDOURA, R.; FETOUI, H. Naringenin Mitigates Iron-Induced Anxiety-Like Behavioral Impairment, Mitochondrial Dysfunctions, Ectonucleotidases and Acetylcholinesterase Alteration Activities in Rat Hippocampus. **Neurochem Res**, v. 40, n. 8, p. 1563-75, Aug 2015c.

CHUN, O. K.; CHUNG, S. J.; SONG, W. O. Estimated dietary flavonoid intake and major food sources of U.S. adults. **J Nutr**, v. 137, n. 5, p. 1244-52, May 2007.

DA SILVA, C. G.; RIBEIRO, C. A.; LEIPNITZ, G.; DUTRA-FILHO, C. S.; WYSE, A. A.; WANNMACHER, C. M.; SARKIS, J. J.; JAKOBS, C.; WAJNER, M. Inhibition of cytochrome c oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. **Biochim Biophys Acta**, v. 1586, n. 1, p. 81-91, Jan 02 2002.

DE OLIVEIRA, M. R.; BRASIL, F. B.; ANDRADE, C. M. B. Naringenin Attenuates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Mitochondrial Dysfunction by an Nrf2-Dependent Mechanism in SH-SY5Y Cells. **Neurochem Res**, v. 42, n. 11, p. 3341-3350, Nov 2017.

DI MEO, S.; REED, T. T.; VENDITTI, P.; VICTOR, V. M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1245049, 2016.

DISTLER, M. G.; PALMER, A. A. Role of Glyoxalase 1 (Glo1) and methylglyoxal (MG) in behavior: recent advances and mechanistic insights. **Front Genet**, v. 3, p. 250, 2012.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002.

DUTRA, F. B., E. J. H. BIOQUÍMICA E AÇÃO CITOTÓXICA DE  $\alpha$ -AMINOCETONAS ENDÓGENAS. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 483-491, 2005.

EL MOHSEN, M. A.; MARKS, J.; KUHNLE, G.; RICE-EVANS, C.; MOORE, K.; GIBSON, G.; DEBNAM, E.; SRAI, S. K. The differential tissue distribution of the citrus flavanone naringenin following gastric instillation. **Free Radic Res**, v. 38, n. 12, p. 1329-40, Dec 2004.

ENNACEUR, A.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. **Behav Brain Res**, v. 31, n. 1, p. 47-59, Nov 1 1988.

ERDMAN, J. W., JR.; BALENTINE, D.; ARAB, L.; BEECHER, G.; DWYER, J. T.; FOLTS, J.; HARNLY, J.; HOLLMAN, P.; KEEN, C. L.; MAZZA, G.; MESSINA, M.; SCALBERT, A.; VITA, J.; WILLIAMSON, G.; BURROWES, J. Flavonoids and heart health: proceedings of the ILSI North America Flavonoids Workshop, May 31-June 1, 2005, Washington, DC. **J Nutr**, v. 137, n. 3 Suppl 1, p. 718S-737S, Mar 2007.

ESPIN, J. C.; GARCIA-CONESA, M. T.; TOMAS-BARBERAN, F. A. Nutraceuticals: facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22-24, p. 2986-3008, Nov-Dec 2007.

FERLEMI, A. V.; MERMIGKI, P. G.; MAKRI, O. E.; ANAGNOSTOPOULOS, D.; KOULAKIOTIS, N. S.; MARGARITY, M.; TSARBOPOULOS, A.; GEORGAKOPOULOS, C. D.; LAMARI, F. N. Cerebral Area Differential Redox Response of Neonatal Rats to Selenite-Induced Oxidative Stress and to Concurrent Administration of Highbush Blueberry Leaf Polyphenols. **Neurochem Res**, v. 40, n. 11, p. 2280-92, Nov 2015.

FERNANDEZ-TWINN, D. S.; OZANNE, S. E. Early life nutrition and metabolic programming. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1212, p. 78-96, Nov 2010.

FISCHER, J. C.; RUITENBEEK, W.; BERDEN, J. A.; TRIJBELS, J. M.; VEERKAMP, J. H.; STADHOUDERS, A. M.; SENGERS, R. C.; JANSSEN, A. J.

Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin Chim Acta**, v. 153, n. 1, p. 23-36, Nov 29 1985.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 97-112, 1995.

GALLAHUE, D. L. O., J. C.; GOODWAY J. D. **Compreendendo o Desenvolvimento Motor: Bebês, Crianças, Adolescentes e Adultos**. 7 Edição. São Paulo: AMGH Editora, 2013.

GAUR, V.; AGGARWAL, A.; KUMAR, A. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain. **Eur J Pharmacol**, v. 616, n. 1-3, p. 147-54, Aug 15 2009.

GIORGIO, M.; TRINEI, M.; MIGLIACCIO, E.; PELICCI, P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 9, p. 722-8, Sep 2007.

GOLECHHA, M.; SARANGAL, V.; BHATIA, J.; CHAUDHRY, U.; SALUJA, D.; ARYA, D. S. Naringin ameliorates pentylentetrazol-induced seizures and associated oxidative stress, inflammation, and cognitive impairment in rats: possible mechanisms of neuroprotection. **Epilepsy Behav**, v. 41, p. 98-102, Dec 2014.

GONG, D. K.; LIU, B. H.; TAN, X. H. Genistein prevents cadmium-induced neurotoxic effects through its antioxidant mechanisms. **Drug Res (Stuttg)**, v. 65, n. 2, p. 65-9, Feb 2015.

GOPINATH, K.; SUDHANDIRAN, G. Naringin modulates oxidative stress and inflammation in 3-nitropropionic acid-induced neurodegeneration through the activation of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 signalling pathway. **Neuroscience**, v. 227, p. 134-43, Dec 27 2012.

GURSUL, C.; EKINCI AKDEMIR, F. N.; AKKOYUN, T.; CAN, I.; GUL, M.; GULCIN, I. Protective effect of Naringin on experimental hindlimb ischemia/reperfusion injury in rats. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 31, n. sup1, p. 56-61, 2016.

GUTOWSKI, M.; KOWALCZYK, S. A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance. **Acta Biochim Pol**, v. 60, n. 1, p. 1-16, 2013.

HALEAGRAHARA, N.; SIEW, C. J.; MITRA, N. K.; KUMARI, M. Neuroprotective effect of bioflavonoid quercetin in 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress biomarkers in the rat striatum. **Neurosci Lett**, v. 500, n. 2, p. 139-43, Aug 15 2011.

HALEAGRAHARA, N.; SIEW, C. J.; PONNUSAMY, K. Effect of quercetin and desferrioxamine on 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induced neurotoxicity in striatum of rats. **J Toxicol Sci**, v. 38, n. 1, p. 25-33, Feb 2013.

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.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, v. 141, n. 2, p. 312-22, Jun 2006.

HALLIWELL, B. **Free Radicals in Biology and Medicine. Fourth ed.** USA: Oxford University Press., 2007. 851

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 5, p. 531-42, Mar 1 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine.** Fifth edition. Oxford, United Kingdom ;: Oxford University Press, 2015. xxxviii, 905 pages

HODKOVA, A.; CERNA, P.; KOTYZOVA, D.; EYBL, V. The effect of iron(III) on the activity of selenoenzymes and oxidative damage in the liver of rats. Interaction with natural antioxidants and deferiprone. **Hemoglobin**, v. 34, n. 3, p. 278-83, Jun 2010.

HOLMGREN, A.; ASLUND, F. Glutaredoxin. **Methods Enzymol**, v. 252, p. 283-92, 1995.

HOLMGREN, A.; BJORNSTEDT, M. Thioredoxin and thioredoxin reductase. **Methods Enzymol**, v. 252, p. 199-208, 1995.

IZQUIERDO, I. **Memória.** 2. ed. rev. e ampl. Porto Alegre: Artmed, 2011.

JEONG, K. H.; JUNG, U. J.; KIM, S. R. Naringin Attenuates Autophagic Stress and Neuroinflammation in Kainic Acid-Treated Hippocampus In Vivo. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, p. 354326, 2015.

JUNG, U. J.; LEEM, E.; KIM, S. R. Naringin: a protector of the nigrostriatal dopaminergic projection. **Exp Neurobiol**, v. 23, n. 2, p. 124-9, Jun 2014.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biol**, v. 1, p. 244-57, Feb 08 2013.

KANDEL, E. R. **Principles of neural science**. 5th. New York: McGraw-Hill, 2013. I, 1709 p.

KODYDKOVA, J.; VAVROVA, L.; KOCIK, M.; ZAK, A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. **Folia Biol (Praha)**, v. 60, n. 4, p. 153-67, 2014.

KREBS, C. W., J; AKESSON, E;. **Neurociências Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 2013.

KULASEKARAN, G.; GANAPASAM, S. Neuroprotective efficacy of naringin on 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial dysfunction through the modulation of Nrf2 signaling pathway in PC12 cells. **Mol Cell Biochem**, v. 409, n. 1-2, p. 199-211, Nov 2015.

KUMAR, A.; PRAKASH, A.; DOGRA, S. Naringin alleviates cognitive impairment, mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by D-galactose in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 48, n. 2, p. 626-32, Feb 2010.

KUMAR, P.; KUMAR, A. Protective effect of hesperidin and naringin against 3-nitropropionic acid induced Huntington's like symptoms in rats: possible role of nitric oxide. **Behav Brain Res**, v. 206, n. 1, p. 38-46, Jan 05 2010.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **ScientificWorldJournal**, v. 2013, p. 162750, 2013.

KUNASEGARAN, T.; MUSTAFA, M. R.; MURUGAN, D. D.; ACHIKE, F. I. The bioflavonoid quercetin synergises with PPAR-gamma agonist pioglitazone in reducing angiotensin-II contractile effect in fructose-streptozotocin induced diabetic rats. **Biochimie**, v. 125, p. 131-9, Jun 2016.

LAGIOU, P.; SAMOLI, E.; LAGIOU, A.; PETERSON, J.; TZONOU, A.; DWYER, J.; TRICHOPOULOS, D. Flavonoids, vitamin C and adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Causes Control**, v. 15, n. 1, p. 67-72, Feb 2004a.

LAGIOU, P.; SAMOLI, E.; LAGIOU, A.; TZONOU, A.; KALANDIDI, A.; PETERSON, J.; DWYER, J.; TRICHOPOULOS, D. Intake of specific flavonoid classes and coronary heart disease--a case-control study in Greece. **Eur J Clin Nutr**, v. 58, n. 12, p. 1643-8, Dec 2004b.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6th. New York: W.H. Freeman, 2013.

LEWANDOWSKA, U.; SZEWCZYK, K.; HRABEC, E.; JANECKA, A.; GORLACH, S. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. **J Agric Food Chem**, v. 61, n. 50, p. 12183-99, Dec 18 2013.

LIEBERMAN, M.; MARKS, A. D.; SMITH, C. M.; MARKS, D. B.; SMITH, C. M. **Marks' essential medical biochemistry**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. xiv, 565 p.

LIN, S. P.; HOU, Y. C.; TSAI, S. Y.; WANG, M. J.; CHAO, P. D. Tissue distribution of naringenin conjugated metabolites following repeated dosing of naringin to rats. **Biomedicine (Taipei)**, v. 4, p. 16, 2014.

LINSEISEN, J.; RADTKE, J.; WOLFRAM, G. [Flavonoid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey]. **Z Ernährungswiss**, v. 36, n. 4, p. 403-12, Dec 1997.

LOSADA-BARREIRO, S.; BRAVO-DIAZ, C. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. **Eur J Med Chem**, v. 133, p. 379-402, Jun 16 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

LU, J.; HOLMGREN, A. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radic Biol Med**, v. 66, p. 75-87, Jan 2014.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 2, p. 156-67, Feb 2008.



MACHADO, A. B. M. H., L. M.; **Neuroanatomia funcional**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2014.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**, v. 79, n. 5, p. 727-47, May 2004.

MANCHOPE, M. F.; CALIXTO-CAMPOS, C.; COELHO-SILVA, L.; ZARPELON, A. C.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; GEORGETTI, S. R.; BARACAT, M. M.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A., JR. Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATP Channel Signaling Pathway. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153015, 2016.

MANI, V. M. S., A. M. M. Naringin modulates the impairment of memory, anxiety, locomotor, and emotionality behaviors in rats exposed to deltamethrin; a possible mechanism association with oxidative stress, acetylcholinesterase and ATPase. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, p. 527-533, 2014.

MARCELINO, T. B.; LONGONI, A.; KUDO, K. Y.; STONE, V.; RECH, A.; DE ASSIS, A. M.; SCHERER, E. B.; DA CUNHA, M. J.; WYSE, A. T.; PETTENUZZO, L. F.; LEIPNITZ, G.; MATTE, C. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. **Neuroscience**, v. 246, p. 28-39, Aug 29 2013.

MEENA, R.; SUPRIYA, C.; PRATAP REDDY, K.; SREENIVASULA REDDY, P. Altered spermatogenesis, steroidogenesis and suppressed fertility in adult male rats exposed to genistein, a non-steroidal phytoestrogen during embryonic development. **Food Chem Toxicol**, v. 99, p. 70-77, Jan 2017.

MEIRA MARTINS, L. A.; VIEIRA, M. Q.; ILHA, M.; DE VASCONCELOS, M.; BIEHL, H. B.; LIMA, D. B.; SCHEIN, V.; BARBE-TUANA, F.; BOROJEVIC, R.; GUMA, F. C. The interplay between apoptosis, mitophagy and mitochondrial biogenesis induced by resveratrol can determine activated hepatic stellate cells death or survival. **Cell Biochem Biophys**, v. 71, n. 2, p. 657-72, Mar 2015.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **J Biol Chem**, v. 247, n. 10, p. 3170-5, May 25 1972.

MORENO-ULLOA, A.; ROMERO-PEREZ, D.; VILLARREAL, F.; CEBALLOS, G.; RAMIREZ-SANCHEZ, I. Cell membrane mediated (-)-epicatechin effects on

upstream endothelial cell signaling: evidence for a surface receptor. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 24, n. 12, p. 2749-52, Jun 15 2014.

NASEEM, M.; PARVEZ, S. Hesperidin restores experimentally induced neurotoxicity in Wistar rats. **Toxicol Mech Methods**, v. 24, n. 7, p. 512-9, Oct 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6th. New York: W.H. Freeman, 2013.

NETTO, C. A.; DIAS, R. D.; IZQUIERDO, I. Differential effect of posttraining naloxone, beta-endorphin, leu-enkephalin and electroconvulsive shock administration upon memory of an open-field habituation and of a water-finding task. **Psychoneuroendocrinology**, v. 11, n. 4, p. 437-46, 1986.

OLSEN, R. K.; CORNELIUS, N.; GREGERSEN, N. Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism. **J Inherit Metab Dis**, v. 38, n. 4, p. 703-19, Jul 2015.

PACKER, L.; CADENAS, E. Oxidants and antioxidants revisited. New concepts of oxidative stress. **Free Radic Res**, v. 41, n. 9, p. 951-2, Sep 2007.

PAPALIA, D. E. F., R. D. **Desenvolvimento Humano**. 12 Edição. São Paulo: AMGH Editora, 2013.

PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 3rd. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press, 2004. xvii, 1309 p.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; ZARPELON, A. C.; MIZOKAMI, S. S.; BORGHI, S. M.; BORDIGNON, J.; SILVA, R. L.; CUNHA, T. M.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, F. Q.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A., JR. The citrus flavonone naringenin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF-kappaB activation. **J Nutr Biochem**, v. 33, p. 8-14, Jul 2016.

RADI, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. **J Biol Chem**, v. 288, n. 37, p. 26464-72, Sep 13 2013.

RADTKE, J.; LINSEISEN, J.; WOLFRAM, G. Fasting plasma concentrations of selected flavonoids as markers of their ordinary dietary intake. **Eur J Nutr**, v. 41, n. 5, p. 203-9, Oct 2002.

RAMAKRISHNAN, A.; VIJAYAKUMAR, N.; RENUKA, M. Naringin regulates glutamate-nitric oxide cGMP pathway in ammonium chloride induced neurotoxicity. **Biomed Pharmacother**, v. 84, p. 1717-1726, Dec 2016.

RAMIREZ-SANCHEZ, I.; MAYA, L.; CEBALLOS, G.; VILLARREAL, F. (-)-epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. **Hypertension**, v. 55, n. 6, p. 1398-405, Jun 2010.

RANAWAT, P.; BAKSHI, N. Naringenin; a bioflavonoid, impairs the reproductive potential of male mice. **Toxicol Mech Methods**, v. 27, n. 6, p. 417-427, Jul 2017.

RANGASWAMI, S., SESHADRI, T. R., VEERARAGHAVIAH, J. Constitution of naringin. The position of the sugar group. **J Proc Ind Acad Sci**, v. 9, p. 328-332, 1939.

RATHI, V. K.; DAS, S.; PARAMPALLI RAGHAVENDRA, A.; RAO, B. S. S. Naringin abates adverse effects of cadmium-mediated hepatotoxicity: An experimental study using HepG2 cells. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 31, n. 8, Aug 2017.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB J**, v. 22, n. 3, p. 659-61, Mar 2008.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 357-63, 1994.

RICE, D.; BARONE, S., JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect**, v. 108 Suppl 3, p. 511-33, Jun 2000.

RUSTIN, P.; CHRETIEN, D.; BOURGERON, T.; GÉRARD, B.; RÖTIG, A.; SAUDUBRAY, J. M.; MUNNICH, A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clin Chim Acta**, v. 228, n. 1, p. 35-51, Jul 1994.

SACHDEVA, A. K.; CHOPRA, K. Naringin mitigate okadaic acid-induced cognitive impairment in an experimental paradigm of Alzheimer's disease. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 110-125, 2015/12/01/ 2015.

SACHDEVA, A. K.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. Naringin ameliorates memory deficits in experimental paradigm of Alzheimer's disease by attenuating

mitochondrial dysfunction. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 127, p. 101-10, Dec 2014.

SAHU, B. D.; TATIREDDY, S.; KONERU, M.; BORKAR, R. M.; KUMAR, J. M.; KUNCHA, M.; SRINIVAS, R.; SHYAM SUNDER, R.; SISTLA, R. Naringin ameliorates gentamicin-induced nephrotoxicity and associated mitochondrial dysfunction, apoptosis and inflammation in rats: possible mechanism of nephroprotection. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 277, n. 1, p. 8-20, May 15 2014.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J Nutr**, v. 130, n. 8S Suppl, p. 2073S-85S, Aug 2000.

SCHWARZLANDER, M.; FINKEMEIER, I. Mitochondrial energy and redox signaling in plants. **Antioxid Redox Signal**, v. 18, n. 16, p. 2122-44, Jun 1 2013.

SEMPLE, B. D.; BLOMGREN, K.; GIMLIN, K.; FERRIERO, D. M.; NOBLE-HAEUSSLEIN, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Prog Neurobiol**, v. 106-107, p. 1-16, Jul-Aug 2013.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **Int J Prev Med**, v. 4, n. 6, p. 624-30, Jun 2013.

SHEN, M.; WANG, L.; YANG, G.; GAO, L.; WANG, B.; GUO, X.; ZENG, C.; XU, Y.; SHEN, L.; CHENG, K.; XIA, Y.; LI, X.; WANG, H.; FAN, L.; WANG, X. Baicalin protects the cardiomyocytes from ER stress-induced apoptosis: inhibition of CHOP through induction of endothelial nitric oxide synthase. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88389, 2014.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, v. 82, n. 2, p. 291-5, Mar 1997.

SIES, H. Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. **J Biol Chem**, v. 289, n. 13, p. 8735-41, Mar 28 2014.

SOUSA SILVA, M.; GOMES, R. A.; FERREIRA, A. E.; PONCES FREIRE, A.; CORDEIRO, C. The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. **Biochem J**, v. 453, n. 1, p. 1-15, Jul 1 2013.

SPENCER, J. P. Flavonoids: modulators of brain function? **Br J Nutr**, v. 99 E Suppl 1, p. ES60-77, May 2008.

SQUIRE, L. R.; KANDEL, E. R. **Memory : from mind to molecules**. 2nd. Greenwood Village, Colo.: Roberts & Co., 2009. xi, 256 p.

SUGANYA, S. N.; SUMATHI, T. Effect of rutin against a mitochondrial toxin, 3-nitropropionic acid induced biochemical, behavioral and histological alterations-a pilot study on Huntington's disease model in rats. **Metab Brain Dis**, v. 32, n. 2, p. 471-481, Apr 2017.

TAMASHIRO, K. L.; WAKAYAMA, T.; BLANCHARD, R. J.; BLANCHARD, D. C.; YANAGIMACHI, R. Postnatal growth and behavioral development of mice cloned from adult cumulus cells. **Biol Reprod**, v. 63, n. 1, p. 328-34, Jul 2000.

TARPEY, M. M.; FRIDOVICH, I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. **Circ Res**, v. 89, n. 3, p. 224-36, Aug 3 2001.

THOMAS, D. D. Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide. **Redox Biol**, v. 5, p. 225-33, Aug 2015.

THORNALLEY, P. J. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. **Biochem J**, v. 269, n. 1, p. 1-11, Jul 1 1990.

THORNALLEY, P. J.; TISDALE, M. J. Inhibition of proliferation of human promyelocytic leukaemia HL60 cells by S-D-lactoylglutathione in vitro. **Leuk Res**, v. 12, n. 11-12, p. 897-904, 1988.

TIWARI, V.; CHOPRA, K. Resveratrol prevents alcohol-induced cognitive deficits and brain damage by blocking inflammatory signaling and cell death cascade in neonatal rat brain. **J Neurochem**, v. 117, n. 4, p. 678-90, May 2011.

VANHEES, K.; COORT, S.; RUIJTERS, E. J.; GODSCHALK, R. W.; VAN SCHOOTEN, F. J.; BARJESTEHE VAN WAALWIJK VAN DOORN-KHOSROVANI, S. Epigenetics: prenatal exposure to genistein leaves a permanent signature on the hematopoietic lineage. **FASEB J**, v. 25, n. 2, p. 797-807, Feb 2011.

VANHEES, K.; VAN SCHOOTEN, F. J.; VAN WAALWIJK VAN DOORN-KHOSROVANI, S. B.; VAN HELDEN, S.; MUNNIA, A.; PELUSO, M.; BRIEDE, J. J.; HAENEN, G. R.; GODSCHALK, R. W. Intrauterine exposure to flavonoids modifies antioxidant status at adulthood and decreases oxidative stress-induced DNA damage. **Free Radic Biol Med**, v. 57, p. 154-61, Apr 2013.

VISWANATHA, G. L.; SHYLAJA, H.; RAO, K. S.; ASHWINI, Y.; KUMAR, V. R.; MOHAN, C. G.; SUNIL, V. G.; KUMAR, M. V.; RAJESH, S. Amelioration of immobilization stress-induced biochemical and behavioral alterations and mitochondrial dysfunction by naringin in mice: possible mechanism of nitric oxide modulation. **Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao**, v. 9, n. 11, p. 1254-63, Nov 2011.

WANG, D.; YAN, J.; CHEN, J.; WU, W.; ZHU, X.; WANG, Y. Naringin Improves Neuronal Insulin Signaling, Brain Mitochondrial Function, and Cognitive Function in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Cell Mol Neurobiol**, v. 35, n. 7, p. 1061-71, Oct 2015.

WANG, D. M.; YANG, Y. J.; ZHANG, L.; ZHANG, X.; GUAN, F. F.; ZHANG, L. F. Naringin Enhances CaMKII Activity and Improves Long-Term Memory in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 3, p. 5576-86, 2013.

WANG, X.; MICHAELIS, E. K. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. **Front Aging Neurosci**, v. 2, p. 12, 2010.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-33, 1981.

WILLIAMS, R. J.; MOHANAKUMAR, K. P.; BEART, P. M. Neuro-nutraceuticals: Further insights into their promise for brain health. **Neurochem Int**, v. 95, p. 1-3, May 2016.

WORKMAN, A. D.; CHARVET, C. J.; CLANCY, B.; DARLINGTON, R. B.; FINLAY, B. L. Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. **J Neurosci**, v. 33, n. 17, p. 7368-83, Apr 24 2013.

XIAO, J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 57, n. 9, p. 1874-1905, Jun 13 2017.

YE, Z. W.; ZHANG, J.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1850, n. 8, p. 1607-21, Aug 2015.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **J Clin Pathol**, v. 54, n. 3, p. 176-86, Mar 2001.

YU, J.; WANG, L.; WALZEM, R. L.; MILLER, E. G.; PIKE, L. M.; PATIL, B. S. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 6, p. 2009-14, Mar 23 2005.

ZHANG, Y.; LIU, B.; CHEN, X.; ZHANG, N.; LI, G.; ZHANG, L. H.; TAN, L. Y. Naringenin Ameliorates Behavioral Dysfunction and Neurological Deficits in a d-Galactose-Induced Aging Mouse Model Through Activation of PI3K/Akt/Nrf2 Pathway. **Rejuvenation Res**, Jul 24 2017.

ZIELINSKY, P.; BUSATO, S. Prenatal effects of maternal consumption of polyphenol-rich foods in late pregnancy upon fetal ductus arteriosus. **Birth Defects Res C Embryo Today**, v. 99, n. 4, p. 256-74, Dec 2013.

ZIELINSKY, P.; MARTIGNONI, F. V.; VIAN, I. Deleterious effects of maternal ingestion of cocoa upon fetal ductus arteriosus in late pregnancy. **Front Pharmacol**, v. 5, p. 281, 2014.

ZIELINSKY, P.; PICCOLI, A. L., JR.; MANICA, J. L.; NICOLOSO, L. H.; MENEZES, H.; BUSATO, A.; MORAES, M. R.; SILVA, J.; BENDER, L.; PIZZATO, P.; AITA, L.; ALIEVI, M.; VIAN, I.; ALMEIDA, L. Maternal consumption of polyphenol-rich foods in late pregnancy and fetal ductus arteriosus flow dynamics. **J Perinatol**, v. 30, n. 1, p. 17-21, Jan 2010.

ZIELINSKY, P.; PICCOLI, A. L., JR.; VIAN, I.; ZILIO, A. M.; NAUJORKS, A. A.; NICOLOSO, L. H.; BARBISAN, C. W.; BUSATO, S.; LOPES, M.; KLEIN, C. Maternal restriction of polyphenols and fetal ductal dynamics in normal pregnancy: an open clinical trial. **Arq Bras Cardiol**, v. 101, n. 3, p. 217-25, Sep 2013.

ZOU, J.; CREWS, F. CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death. **Cell Mol Neurobiol**, v. 26, n. 4-6, p. 385-405, Jul-Aug 2006.

## Anexos

### Anexo I – Carta de Aprovação da CEUA



**U F R G S**

UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

**Comissão De Ética No Uso De Animais**



#### **CARTA DE APROVAÇÃO**

**Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:**

**Número:** 31397

**Título:** AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO PRÉ-NATAL COM NARINGINA SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS NA PROLE DE RATAS WISTAR

**Vigência:** 11/05/2016 à 10/05/2018

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

CRISTIANE MATTE - coordenador desde 11/05/2016  
Bernardo Gindri dos Santos - Aluno de Mestrado desde 11/05/2016

*Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 27/06/2016 - SALA 330 DO ANEXO I DO PRÉDIO DA REITORIA - CAMPUS CENTRO - UFRGS-PAULO DA GAMA,110 BAIRRO FARROUPILHA -, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 77 ratos Wistar machos e 154 ratos Wistar fêmeas de 60 dias, e filhotes provenientes do acasalamento (216 fêmeas e 48 machos), os quais serão obtidos do biotério do Departamento de Bioquímica UFRGS, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.*

Porto Alegre, Sexta-Feira, 8 de Julho de 2016

MARCELO MELLER ALIEVI  
Coordenador da comissão de ética



## **Anexo II – Normas de Publicação do Periódico Científico Free Radical Research**

### About the journal

*Free Radical Research* is an international, peer reviewed journal, publishing high-quality, original research. Please see the journal's [Aims & Scope](#) for information about its focus and peer-review policy.

Please note that this journal only publishes manuscripts in English.

This journal accepts the following article types: Original articles and Review articles.

### Peer review

Taylor & Francis is committed to peer-review integrity and upholding the highest standards of review. Once your paper has been assessed for suitability by the editor, it will then be single blind peer-reviewed by independent, anonymous expert referees. Find out more about [what to expect during peer review](#) and read our guidance on [publishing ethics](#).

### Preparing your paper

All authors submitting to medicine, biomedicine, health sciences, allied and public health journals should conform to the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#), prepared by the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE).

### *Structure*

Your paper should be compiled in the following order: title page; abstract; keywords; main text; acknowledgments; declaration of interest statement; references; table(s) with caption(s) (on individual pages); figures; figure captions (as a list).

**Reviews:** The body of a review article should be a comprehensive, scholarly evidence-based review of the literature, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions. Wherever appropriate details of the literature search methodology should be provided, i.e. the databases searched, the search terms and inclusive dates, and any selectivity criteria imposed. Wherever possible, use primary resources, avoiding “Data on File”, “Poster” or other unpublished references.

### *Word count*

Please include a word count for your paper. There are no word limits for this journal.

### *Style guidelines*

Please refer to these [style guidelines](#) when preparing your paper, rather than any published articles or a sample copy.

Please use American spelling consistently throughout your manuscript.

Please use double quotation marks, except where "a quotation is 'within' a quotation". Please note that long quotations should be indented without quotation marks.

### *Formatting and templates*

Papers may be submitted in any standard format, including Word and LaTeX. Figures should be saved separately from the text. To assist you in preparing your paper, we provide formatting template(s).

[Word templates](#) are available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

A [LaTeX template](#) is available for this journal. Please save the template to your hard drive, ready for use.

If you are not able to use the templates via the links (or if you have any other template queries) please contact [authortemplate@tandf.co.uk](mailto:authortemplate@tandf.co.uk)

### *References*

Please use this [reference guide](#) when preparing your paper. An [EndNote output style](#) is also available to assist you.

### *Checklist: what to include*

1. **Author details.** Please ensure everyone meeting the International Committee of Medical Journal Editors (ICJME) [requirements for authorship](#) is included as an author of your paper. Please include all authors' full names, affiliations, postal addresses, telephone numbers and email addresses on the cover page. Where available, please also include [ORCiDs](#) and social media handles (Facebook, Twitter or LinkedIn). One author will need to be identified as the corresponding author, with their email address normally displayed in the article PDF (depending on the journal) and the online article. Authors' affiliations are the affiliations where the research was conducted. If any of the named co-authors moves affiliation during the peer-review process, the new affiliation can be given as a footnote. Please note that no changes to affiliation can be made after your paper is accepted. [Read more on authorship](#).
2. A non-structured **abstract** of no more than 250 words, summarising the central core of knowledge that is the focus of the paper. It should be written in an informative style permitting its use, without revision, by abstracting services, give essential details of research findings without further reference to Read tips on [writing your abstract](#).
3. **Graphical abstract.** This is an image to give readers a clear idea of the content of your article. It should be a maximum width of 525 pixels. If your image is narrower than 525 pixels, please place it on a white background 525 pixels wide to ensure the dimensions

are maintained. Save the graphical abstract as a .jpg, .png, or .gif. Please do not embed it in the manuscript file but save it as a separate file, labelled GaphicalAbstract1.

4. You can opt to include a **video abstract** with your article. [Find out how these can help your work reach a wider audience, and what to think about when filming.](#)
5. Five **keywords**. The keywords will assist indexers in cross-indexing your article. Read [making your article more discoverable](#), including information on choosing a title and search engine optimization.
6. **Funding details**. Please supply all details required by your funding and grant-awarding bodies as follows:  
*For single agency grants:* This work was supported by the under Grant .  
*For multiple agency grants:* This work was supported by the under grant under Grant and under grant .
7. **Disclosure statement**. This is to acknowledge any financial interest or benefit that has arisen from the direct applications of your research. [Further guidance on what is a conflict of interest and how to disclose it.](#)
8. **Geolocation information**. Submitting a geolocation information section, as a separate paragraph before your acknowledgements, means we can index your paper's study area accurately in JournalMap's geographic literature database and make your article more discoverable to others. [More information.](#)
9. **Supplemental online material**. Supplemental material can be a video, dataset, fileset, sound file or anything which supports (and is pertinent to) your paper. We publish supplemental material online via Figshare. Find out more about [supplemental material and how to submit it with your article.](#)
10. **Figures**. Figures should be high quality (1200 dpi for line art, 600 dpi for grayscale and 300 dpi for colour). Figures should be saved as TIFF, PostScript or EPS files.
11. **Tables**. Tables should present new information rather than duplicating what is in the text. Readers should be able to interpret the table without reference to the text. Please supply editable files.
12. **Equations**. If you are submitting your manuscript as a Word document, please ensure that equations are editable. More information about [mathematical symbols and equations.](#)
13. **Units**. Please use [SI units](#) (non-italicized).