



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

ANDRÉ TERACIO BEZERRA DE MORAIS

**PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL: EVENTUAIS CONSEQUÊNCIAS DA
INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO, SENSORIO-MOTOR E DA ATIVIDADE
LOCOMOTORA**

Recife
2017

ANDRÉ TERACIO BEZERRA DE MORAIS

**PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL: EVENTUAIS CONSEQUÊNCIAS DA
INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO, SENSORIO-MOTOR E DA ATIVIDADE
LOCOMOTORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Fisioterapia.

Linha de Pesquisa: Fisioterapia:

Desempenho físico-funcional e qualidade de vida.

Orientadora: Prof^a. Dr. Ana Elisa Toscano

Coorientador: Prof^o. Dr^o. Raul Manhães de Castro

Recife

2017

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

M827p Morais, André Teracio Bezerra de.
 Paralisia cerebral experimental: consequências da inibição farmacológica da recaptação da serotonina sobre o desenvolvimento somático sensório-motor e da atividade locomotora / André Teracio Bezerra de Moraes. – Recife: o autor, 2017.
 116 f.; il; 30 cm.

 Orientadora: Ana Elisa Toscano.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em fisioterapia.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Asfixia. 2. Restrição física. 3. Serotonina. 4. Crescimento e desenvolvimento. 5. Locomoção. I. Toscano, Ana Elisa. (orientadora). II. Título.

615.8 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 056)

ANDRÉ TERACIO BEZERRA DE MORAIS

**PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL: EVENTUAIS CONSEQUÊNCIAS DA
INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA RECAPTAÇÃO DA SEROTONINA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO, SENSORIO-MOTOR E DA ATIVIDADE
LOCOMOTORA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de mestre em Fisioterapia.

Aprovado em: 14/03/2017.

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF^a. DR^a. DANIELLA ARAÚJO DE OLIVEIRA – FISIOTERAPIA / UFPE

PROF^o. DR^o JOSÉ ANTÔNIO DOS SANTOS – NÚCLEO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E
CIÊNCIA DO ESPORTE / CAV / UFPE

PROF^o. DR^o OMAR GUZMÁN QUEVEDO - UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLAS DE HIDALGO

Aos meus pais, que sempre me incentivaram em qualquer que fosse a atividade que eu fizesse, e me instruíram antes de tudo a ser uma pessoa de caráter.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus todas as oportunidades que ele criou na minha vida. Todos os pilares que nos sustentam como saúde, família, amigos e amor ao próximo, fazem parte do seu grande plano.

Ao meu pai José Adelson de Moraes, ofereço a gratidão por sempre ter me servido como espelho de como um homem deve ser. Exemplo de coragem, leva consigo o sangue do meu avô José Teracio, que o torna um grande batalhador ao mesmo tempo não esconde o grande coração que tem.

À minha mãe, Rejane Bezerra de Moraes o meu agradecimento por me passar tranquilidade e segurança em todos os momentos, além de ser um poço de ternura, aconchego e cuidado.

À minha avó Elizabete Leitão, e as minhas irmãs Juliana e Déborah pelo companheirismo, gestos de amor diários e muitas apoios durante essa caminhada.

Minha noiva e companheira de vida, Elaine Moraes pelo incentivo, paciência e muito carinho dedicado.

Meus colegas de laboratório do LAFINNT que me ajudaram muito a entender esse novo campo de pesquisa e a realizar os procedimentos necessários. Especialmente a Diego Lacerda, Sabrina Pereira e minhas estagiárias Gleyciele, Débora e Vanessa.

Meus orientadores Ana Elisa e Raul Manhães pelo acompanhamento, pela preocupação e por terem acreditado no meu trabalho.

Aos professores do mestrado em Fisioterapia, e aos facilitadores da nossa vida, Niége e Rafael.

Agradeço ao CNPq pelo financiamento do projeto.

RESUMO

A paralisia cerebral (PC) é uma desordem neurológica que altera funções motoras, além de retardar o crescimento somático e a maturação dos reflexos. A serotonina (5-HT) age como um importante neuromodulador no sistema nervoso central e periférico, alterando a plasticidade dos circuitos neurais e se apresentando como um fator que pode alterar alguns efeitos deletérios da PC através de sua manipulação farmacológica. Esse estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da inibição farmacológica da recaptação da 5-HT através do uso da fluoxetina, sobre a maturação somática, ontogênese reflexa, desenvolvimento motor e número de células no córtex somatossensorial em ratos submetidos ao modelo experimental de paralisia cerebral. Estudo de caráter experimental, composto por 64 ratos *Wistar* machos com distribuição entre os grupos: 1- Controle/Salina (C+S=13), 2- Controle/Fluoxetina (C+F=18), 3- Anóxia perinatal e restrição sensório-motora/Salina (PC+S=17), 4- Anóxia perinatal e restrição sensório-motora/Fluoxetina (PC+F=16). O tratamento farmacológico foi administrado do 2º ao 21º dia pela via subcutânea, na região dorsal do animal, utilizando uma concentração de 10 mg/Kg do peso corporal. O controle utilizou 10ml/kg de solução de Cloreto de Sódio (NaCl) a 0,9%. O crescimento somático foi avaliado em dias alternados, a maturação das características físicas e a ontogênese de reflexos foram avaliados diariamente até o seu aparecimento. O desenvolvimento da atividade locomotora foi avaliado através de filmagens dos animais em um campo aberto em dias alternados. A avaliação da coordenação foi realizada pelo teste de rotarod no 29º dia, no qual também os animais foram eutanaziados e houve a retirada de tecido encefálico para análise histológica do córtex somatossensorial. Para verificação da distribuição normal e a homogeneidade das variâncias foi utilizado o teste de Kolmogorov-smirnov. A comparação de médias foi realizada pelos testes Anova Two Way e Kruskal-wallis. Houve uma diminuição do peso ($p<0,05$) nos ratos submetidos à PC e nos que fizeram uso da Fluoxetina. Nos parâmetros avaliados do desenvolvimento somático, os animais PC e os animais que sofreram a PC associada a manipulação farmacológica tiveram menores medidas do comprimento da cauda ($p<0,05$). O eixo longitudinal e o látero lateral do crânio foram menores ($p<0,05$) no grupo PC em relação ao grupo controle, e do grupo PC que sofreu a manipulação farmacológica em comparação aos que não sofreram. A distância total (m), a velocidade média

(m/s), a potência média (mW) e o tempo parado (s) foram menores ($p<0,05$) para os grupos C+F e PC+S comparados ao grupo C+S. Foi observado também uma diminuição ($p<0,05$) nesses mesmos parâmetros do grupo PC+F comparado ao grupo PC+S. A coordenação foi menor ($p<0,05$) no grupo C+F comparado ao grupo C+S e no grupo PC+S comparado ao grupo C+S. Houve uma diminuição ($p<0,05$) do número de neurônios e um aumento ($p<0,05$) das células da glia no córtex somatossensorial no grupo PC+S comparado ao C+S, assim como no grupo PC+F comparado ao grupo PC+S. A inibição farmacológica neonatal exacerba os efeitos sobre o desenvolvimento somático, motor, atividade locomotora e plasticidade neural do córtex somatossensorial em animais submetidos a modelo experimental de PC.

PALAVRAS-CHAVE:

Asfixia. Restrição física. Serotonina. Inibidores da Captação de Serotonina. Crescimento e Desenvolvimento. Locomoção. Plasticidade Neuronal.

ABSTRACT

Cerebral palsy (CP) is a neurological disorder that alters motor functions, and slows somatic growth and maturation of reflexes. Serotonin (5-HT) acts as an important neuromodulator in the central and peripheral nervous system, altering the plasticity of neural circuits and presenting as a factor that can alter some deleterious effects of CP through its pharmacological manipulation. This study aims to evaluate the effects of pharmacological inhibition of 5-HT reuptake through the use of fluoxetine on somatic maturation, reflex ontogenesis, motor development and number of cells in the somatosensory cortex in rats submitted to the experimental model of cerebral palsy. Experimental study, consisting of 64 male Wistar rats with a distribution between groups: 1-Control / Saline (C + S = 13), 2-Control / Fluoxetine (C + F = 18), 3-Perinatal anoxia and sensory-motor restraint / Saline (PC + S = 17), 4 - Perinatal anoxia and sensory-motor restraint / Fluoxetine (PC + F = 16). Pharmacological treatment was administered subcutaneously, using a concentration of 10 mg / kg body weight, from the 2nd to the 21st day. The control used 10 ml / kg of 0.9% Sodium Chloride (NaCl) solution. Somatic growth was evaluated on alternate days, maturation of physical characteristics and reflex ontogenesis were evaluated daily until its appearance. The development of the locomotor activity was evaluated by filming the animals on alternate days. The evaluation of the coordination was performed by the rotarod test on the 29th day, in which the animals were also euthanized and the brain tissue was removed for histological analysis of the somatosensory cortex. There was a decrease in weight ($p < 0.05$) in the rats submitted to CP and in those who used Fluoxetine. In the evaluated parameters of the somatic development, the PC animals and the animals that suffered CP associated with pharmacological manipulation had smaller measures of the tail length ($p < 0.05$). The longitudinal and lateral axes of the skull were smaller ($p < 0.05$) in the PC group than in the control group, and in the PC group that underwent pharmacological manipulation compared to those who did not. The mean distance (m), mean speed (m / s), mean power (mW) and standing time (s) were lower ($p < 0.05$) for C + F and PC + S groups compared to group C + S. It was also observed a decrease ($p < 0.05$) in these same parameters of the PC + F group compared to the PC + S group. There was a decrease ($p < 0.05$) in the number of neurons and an increase ($p < 0.05$) of the glia cells in the somatosensory cortex in the PC + S group

compared to the C + S group, as well as in the PC + F group compared to the PC + S group. Neonatal pharmacological inhibition exacerbates the effects on the somatic development, motor, locomotor activity and neural plasticity of the somatosensory cortex in animals submitted to an experimental PC model.

KEY WORDS: Asphyxia. Restraint Physical. Serotonin. Serotonin Uptake Inhibitors. Growth and Development. Locomotion. Neuronal Plasticity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Materiais utilizados no procedimento de anóxia perinatal.....	32
Figura 2 –	Restrição sensório-motora	32
Figura 3 –	Esquema das áreas do campo aberto.....	38
Figura 4 –	Animal realizando teste de coordenação motora ao 29º dia no Rotarod	39
Figura 5 –	Imagem digitalizada representativa de secções coradas com Hematoxilina e Eosina, coradas mostrando a camada V da área de representação das patas posteriores no córtex somatossensorial de um animal do grupo Controle Salina.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PC	Paralisia Cerebral
5-HT	Serotonina
SN	Sistema Nervoso
ISRS	Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
LPS	Lipolissacarídeos
AP	Anóxia Perinatal
SR	Restrição Sensóriomotora
CPG	Gerador de Paydrão Central
SERT	Transportadores de Serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
NACL	Cloreto de Sódio
SC	Subcutânea
EVA	Etil Vinil Acetato

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Paralisia Cerebral (PC) e PC experimental.....	17
2.2 Desenvolvimento do sistema nervoso (SN) e plasticidade.	19
2.3 Serotonina e Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina.....	21
2.4 Reflexos e Desenvolvimento Motor Normal.....	24
3 JUSTIFICATIVA.....	27
4 HIPÓTESE	28
5 OBJETIVOS.....	29
5.1 Objetivo Geral:.....	29
5.2 Objetivos Específicos:	29
6 MATERIAL E MÉTODOS	30
6.1 Animais:	30
6.2 Formação dos grupos experimentais:.....	30
6.3 Manipulação farmacológica (Fluoxetina)	31
6.4 Anóxia e Restrição sensório-motora:.....	31
6.5 Procedimentos	33
6.6 Medidas de desfecho e definição das variáveis:.....	41
6.6.1 Variáveis independentes	41
6.6.2 Variáveis dependentes.....	41
7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
8 RESULTADOS.....	44
9 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICE A- NEONATAL ADMINISTRATION OF FLUOXETINE INCREASES SOMATIC DAMAGE AND NEUROMOTORS OF RATS SUBMITTED TO AN EXPERIMENTAL MODEL	57

APÊNDICE B– OROFACIAL FUNCTIONS IN EXPERIMENTAL MODELS OF CEREBRAL PALSY: A SYSTEMATIC REVIEW.....	91
ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS ...	114
ANEXO B – FICHA DE AVALIAÇÃO DOS REFLEXOS.....	115
ANEXO C – FICHA DE AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO.....	116

1 INTRODUÇÃO

A paralisia cerebral (PC) apresenta incidência de 1,2 a 2,3 por 1.000 crianças em idade escolar, sendo considerada a causa mais comum de disfunção motora crônica na infância (FERRAZ et al., 2010). Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, no entanto, a incidência é maior, pois esses países reúnem condições mais favoráveis à ocorrência de problemas crônicos como a PC (HIMMELMANN et al., 2011). Estima-se que no Brasil surgem 17.000 novos casos por ano (ARAÚJO, 2012).

A PC compreende um grupo de desordens do movimento e da postura que causam limitação funcional e são atribuídas a distúrbios não progressivos que ocorrem no sistema nervoso central fetal ou da criança em desenvolvimento (ROSENBAUM et al., 2007). Esta doença pode estar associada a déficits na percepção somatossensorial e/ou alterações no desenvolvimento normal do sistema somatossensorial (BAX M, GOLDSTEIN M, 2005). Grande parte dos pacientes com PC exibem aumento dos reflexos, hipertonicidade e marcha característica em tesoura, podem apresentar também atrofia e fraqueza muscular (KRIGGER, 2006). Esses pacientes apresentam inabilidade em controlar as funções motoras devido à redução do número de unidades motoras efetivas, o que leva ao controle muscular anormal (KOMAN et al., 2004). Isto pode afetar diretamente a capacidade exploratória, o aprendizado e a independência (JONES et al., 2007). Há mudanças no comprimento e/ou na estrutura muscular e dos ossos (NOVACHECK; GAGE, 2007), como anormalidades no tamanho das fibras musculares e transição de seus fenótipos de lentas para rápidas, evidências observadas em biópsias de fibras musculares de paciente com PC (ITO et al., 1996; MARBINI et al., 2002). Conforme o cenário de mudanças propostos pela PC, também foi observado um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e nos níveis de radicais livres em modelo experimental de paralisia cerebral (STIGGER; FELIZZOLA; et al., 2011). Numa abordagem mais profunda em estudos experimentais, os déficits nas funções motoras e cognitivas têm sido associados com alterações nos números e na organização das sinapses, especialmente nas áreas do córtex cerebral e no núcleo estriado (BERG et al., 2000). Alterações nos padrões de movimentos causam mudanças nas representações dessa área, devido a isso as alterações na histologia

cerebral nos modelos de PC devem ser estudadas com atenção (MARCUIZZO et al., 2010).

Assim como as evidências experimentais indicam diversas mudanças biológicas em resposta a uma patologia, elas mostram também que neurotransmissores são utilizados como sinais de desenvolvimento, que modulam a construção e plasticidade dos circuitos neurais (LIPTON; KATER, 1989). A serotonina (5-HT) pode modular eventos do desenvolvimento, incluindo a divisão celular, migração neuronal, diferenciação das células e sinaptogênese, através de uma grande variedade de receptores com ações limitadas e diferenciadas durante períodos específicos do desenvolvimento (GASPAR et al., 2003; AZMITIA, 2006). Nesse contexto, a modulação do sistema serotoninérgico através do aumento da disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica, por meio da manipulação farmacológica com inibidores seletivos da recaptação da serotonina, tem sido bastante estudada.

Uma das maneiras de estudar os efeitos da manipulação farmacológica no desenvolvimento é através da avaliação do desenvolvimento neuromotor, que pode ser representando também pela ontogênese dos reflexos. (LOPES DE SOUZA et al., 2004; DEIRÓ et al., 2008; GALINDO et al., 2015). Os reflexos são respostas motoras estereotipadas do sistema nervoso central em resposta a estímulos internos ou externos (ZEHR; STEIN, 1999). Os reflexos são considerados indicadores do desenvolvimento do sistema nervoso (SN), pois caracterizam a ocorrência simultânea de vários eventos do desenvolvimento do SN, obedecendo a uma sequência predeterminada de acordo com a idade dos animais (FOX, 1965; SMART; DOBBING, 1971).

A plasticidade fenotípica retrata a habilidade de um organismo alterar sua fisiologia e/ou morfologia em decorrência de sua interação com o ambiente (STEARNS et al., 1991). Em estudos com inibidores seletivos de recaptação da serotonina observaram que o possível aumento nos níveis deste neurotransmissor na fase perinatal do desenvolvimento está associado com alterações na maturação de reflexos em roedores (DEIRÓ et al., 2008), além de prejuízo nas atividades motoras (RIBAS et al., 2008; LEE; LEE, 2012). Mais recentemente, observamos que a inibição farmacológica neonatal da recaptação da serotonina protege as células neurais do stress oxidativo durante o desenvolvimento do cérebro (NOVÍO et al., 2011; MORETTI et al., 2012). Esta interessante evidência sugere um papel protetor

da atividade serotoninérgica sobre o desenvolvimento neural.

O manejo terapêutico da paralisia cerebral é principalmente de acompanhamento das sequelas e nenhum dos tratamentos atuais oferecidos tentam corrigir o problema principal de uma lesão cerebral. Entretanto, a alteração da plasticidade cerebral é um dos mecanismos de tratamentos de problemas neurológicos. BUDHDEO; RAJAPAKSA(2011) afirmam isso e apresenta evidências que sugerem que este é o mecanismo de ação dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), inclusive no tratamento da depressão. Achados encorajadores de melhorias motoras em pacientes com vítimas de acidente vascular cerebral (AVC) tratados com ISRS (CHOLLET et al., 2011) sugerem a possibilidade de melhorias semelhantes na paralisia cerebral (BUDHDEO; RAJAPAKSA, 2011). Além dessas melhorias, a alteração da plasticidade no desenvolvimento neuromotor pode atuar auxiliando na evolução dos tratamentos, visto que animais submetidos à injúrias no período neonatal desenvolvem alterações do sistema neuromúsculo-esquelético (MARCUIZZO et al., 2010; STIGGER; NASCIMENTO, DO; et al., 2011; MEIRELES et al., 2017). Mediante a essas observações foi pretensão deste estudo experimental avaliar o papel dos ISRS na maturação somática, ontogênese reflexa e desenvolvimento da atividade locomotora de animais submetidos à paralisia cerebral experimental. Diante das várias evidências anteriormente referidas, foi postulado um papel benéfico dessas substâncias que aumentam os níveis cerebrais de 5-HT quando aplicadas precocemente no desenvolvimento neuromotor de indivíduos já acometidos pela paralisia cerebral.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Paralisia Cerebral (PC) e PC experimental.

A paralisia cerebral é uma síndrome de prejuízo motor e distúrbios permanentes do desenvolvimento, causando limitações das atividades, que são atribuídas a distúrbios não progressivos que ocorrem no desenvolvimento do cérebro fetal ou infantil (COLVER et al., 2014). Os prejuízos motores presentes são geralmente acompanhados de distúrbios de sensibilidade, percepção, cognição, comunicação e comportamento, pela epilepsia, e por afecções musculoesqueléticas secundárias (ROSENBAUM et al., 2007).

A complexidade na forma da apresentação da doença é observada nas suas várias classificações (KOMAN et al., 2004). A paralisia pode ser definida de acordo com a localização anatômica da lesão cerebral (córtex piramidal, trato piramidal, sistema extrapiramidal, ou cerebelo); sintomas e sinais clínicos (espasticidade, formas distônicas, coreoatetóide ou ataxia); distribuição topográfica (diplegia, quadriplegia, ou hemiplegia); tempo do insulto presumido, (préparto, intraparto e pós parto); e classificação do grau do tônus muscular (isotônica, hipotônica ou hipertônica) (REBEL et al., 2010). As condições apresentadas englobam fatores heterogêneos quanto à etiologia, sinais clínicos e a severidade de comprometimentos. McIntyre et al., 2013, publicaram uma revisão sistemática apontando 10 fatores de risco associados significativamente com a PC: anormalidades placentárias, defeitos congênitos, baixo peso ao nascer, aspiração de mecônio, cesariana de emergência, asfixia ao nascer, convulsões neonatais, síndrome do desconforto respiratório, hipoglicemia e infecções neonatais.

A PC é composta por dificuldades na realização do movimento e da manutenção da postura causando limitação funcional e são atribuídas a distúrbios não progressivos que ocorrem no sistema nervoso central fetal ou da criança em desenvolvimento (COLVER et al., 2014). São associados à doença alterações no desenvolvimento, além de déficits de percepção ambos do sistema somatossensorial (BAX M, GOLDSTEIN M, 2005). Grande parte dos pacientes com PC exibem aumento dos reflexos, hipertonicidade, marcha característica em tesoura e podem apresentar também atrofia e fraqueza muscular (KRIGGER, 2006). Além das pesquisas realizadas para esclarecer a incidência da doença, a neurociência

moderna vem apresentando um crescente número de estudos a respeito da patogênese e de potenciais terapias para a PC (KIASATDOLATABADI et al., 2016; LISOVSKA et al., 2016). Esse progresso não seria possível sem os estudos com modelos experimentais, a maioria com o objetivo de replicar uma ou mais características da paralisia cerebral em animais em desenvolvimento (JOHNSTON et al., 2005).

Existem diversos modelos experimentais de paralisia cerebral, através de agressões na fase gestacional e perinatal, com o objetivo de reproduzir os efeitos dessa condição clínica nas pesquisas, como a espasticidade e os déficits motores (BOKSA, 2010; STIGGER; FELIZZOLA; et al., 2011; LACERDA, DIEGO CABRAL et al., 2017). Os modelos são variados e tão heterogêneos quanto a própria doença. A variação entre os modelos acontece de acordo com os diferentes focos do problema (déficits motores, cognitivos), como o tempo necessário para a injúria (período gestacional, período neonatal), com o mecanismo de lesão (acidente vascular cerebral, sepse, malformação, asfixia), alvo da lesão (substância branca, neurônios), espécie (ratos, coelhos, camundongos), e o resultado funcional (JOHNSTON et al., 2005). O acidente vascular cerebral perinatal é uma causa importante de paralisia cerebral (MACHADO et al., 2015), e alguns modelos estão sendo desenvolvidos com a oclusão transitória da artéria cerebral média usando a técnica do filamento (MANABAT et al., 2003), ou a combinação da ligação permanente da artéria cerebral média e a oclusão transitória da artéria carótida (RENOLLEAU et al., 1998). Os pontos fracos desses estudos é que não tem como mensurar a quantidade de reperfusão sanguínea após os modelos cirúrgicos.

Por outro lado, a hipóxia-isquemia pode ser alcançada através de diferentes técnicas, como a anóxia perinatal e a ligação cirúrgica unilateral da artéria carótida por algumas horas em ratos com sete dias de vida (RICE et al., 1981; JOHNSTON et al., 2005). O método de ligação da artéria carótida foi abordado em numerosos estudos para elucidar a patogênese das lesões hipóxico isquêmicas. A preexposição a lipopolissacarídeos (LPS) em modelos de hipóxia isquêmica tem obtido uma potencialização da injúria, aumentando a inflamação na fase inicial induzindo a um estado crônico e secundário de inflamação ao cérebro em desenvolvimento, conferindo um acréscimo da vulnerabilidade (EKLIND et al., 2005). Contudo, os efeitos causados pela inflamação através do LPS não apresentaram déficits severos

no desenvolvimento motor ou alterações musculares típicas da PC, como padrão anormal da marcha, e espasticidade crônica (MARBINI et al., 2002; STIGGER; FELIZZOLA; et al., 2011). Outro modelo de indução a paralisia cerebral estudado, consiste na infecção materna por diferentes tipos de vírus ou bactérias causando lesões de hipomielinização difusas no cérebro sendo responsáveis por efeitos como aumento do estresse oxidativo, lesões na substância branca e mudanças hipocampais (BOKSA, 2010; ROUSSET et al., 2013).

O modelo de indução a PC utilizado pelo nosso grupo de pesquisa apresenta facilidade de reprodução, baixo custo e pequena mortalidade. Criado por (STRATA et al., 2004), consiste na indução da paralisia cerebral através de duas técnicas. A submissão à anóxia perinatal, levando o animal a experimentar dois episódios de anóxia nos dois primeiros dias de vida. Associado à restrição sensório motora, que consiste na imobilização dos membros posteriores em extensão induzindo um comportamento do tipo espástico, hipertônico e com déficits motores, para observar os efeitos no desenvolvimento do comportamento motor e organização do córtex motor primário (STRATA et al., 2004). Resultados encontrados em estudos recentes sobre esse modelo mostram redução na área transversal das fibras musculares, degeneração articular na região afetada pela restrição e mudanças nas fibras do córtex, com redução de neurônios e desorganização topográfica na representação cortical (MARCUIZZO et al., 2008; STIGGER; FELIZZOLA; et al., 2011). A combinação das duas técnicas, Anóxia perinatal e restrição sensório motora (AP+SR), debilitaram significativamente o aparecimento dos reflexos, como a estabilidade em uma superfície inclinada, e o reflexo de colocação das patas posteriores, além de causar prejuízo na aquisição de habilidades motoras (MARCUIZZO et al., 2010). Essa associação AP+SR prejudica o desenvolvimento motor em geral (STRATA et al., 2004; MARCUIZZO et al., 2010). Dessa forma, a utilização do rato como objeto do estudo experimental, obedecendo aos critérios éticos, permite a observação e acompanhamento do desenvolvimento do animal, auxiliando a elucidar as modificações nas estruturas neurais e motoras.

2.2 Desenvolvimento do sistema nervoso (SN) e plasticidade.

O desenvolvimento é um processo que se inicia na concepção e se estende ao longo da vida. Durante esse período há alterações comportamentais e fisiológicas que podem ser induzidas por influências ambientais e por fatores genéticos (RICE;

BARONE, 2000). No que concerne ao desenvolvimento do SN, alguns processos do desenvolvimento são finalizados na gestação, enquanto outros continuam durante anos após o nascimento (RICE; BARONE, 2000)

Em geral, a histogênese do sistema nervoso central em todos os mamíferos pode ser dividida em três fases principais: Organogênese; Neurogênese e gliogênese; (MORGANE et al., 1993). A maturação cerebral engloba vários estágios sobrepostos temporalmente seguindo uma seqüência que varia entre as espécies animais (MORGANE et al., 2002). A concepção de que há períodos do desenvolvimento durante os quais o organismo é particularmente vulnerável a mudanças, representam algo chamado de janela de desenvolvimento, e está baseado na consequência do impacto de algum agravo precoce ao cérebro (MORGANE et al., 2002).

Essa capacidade do sistema nervoso de modificar a sua organização e função através de experiências individuais é chamada de plasticidade (KOLB et al., 2003). Ela é segundo essa definição, susceptível a variações resultadas por diferentes situações, como doenças, administração de drogas, fatores genéticos e ambientais (MORGANE et al., 1993). O crescimento axonal, a morfologia dendrítica, a morte celular, e a neurogênese pertencem aos mecanismos de plasticidade do tamanho da célula, que resulta em variações de densidade, distribuição de neurotransmissores e receptores, espessura cortical e tamanho do cérebro. Algumas partes do cérebro possuem maior potencial para plasticidade, por exemplo, o córtex cerebral (KOLB et al., 2003). As células do córtex formam seis camadas distintas, e quando as células chegam a seus locais designados, elas se diferenciam em neurônios (KOLB; GIBB, 2011). A maturação neuronal é adquirida com o crescimento de axônios e dendritos e estes processos são guiados por sinais ambientais (KOLB; GIBB, 2011).

O conceito relativo ao impacto do agravo precoce ao cérebro está baseado na concepção de que há períodos do desenvolvimento durante os quais o organismo é particularmente vulnerável e que representam uma única janela de desenvolvimento, que não pode ser revertida ou repetida em um período posterior (MORGANE et al., 1993). Outros estímulos como exposição ao álcool, fumo e outras drogas podem provocar esse tipo de mudança (HALES; BARKER, 2001). Os diferentes modelos de

indução à PC são considerados injúrias impostas aos animais justamente nesse período considerado crítico e alterações foram encontradas no desenvolvimento neuromotor e nos tecidos neurológicos (MARCUIZZO et al., 2010; MARQUES et al., 2014; SILVA et al., 2016).

Como os tratamentos oferecidos para a paralisia cerebral até o momento não conseguem corrigir o problema principal das lesões cerebrais, outros mecanismos de ação para enfrentar a PC são sugeridos, visto que alguns problemas neurológicos podem ser tratados alterando-se a plasticidade cerebral (BUDHDEO; RAJAPAKSA, 2011). Alguns estudos propõem a manipulação farmacológica juntamente com os inibidores seletivos de recaptação da serotonina (ISRS) com o objetivo de modificar a plasticidade cortical, afirmando que esse tratamento pode ajudar no desenvolvimento do SN criando mecanismos corticais alternativos, e revertendo assim alguns déficits funcionais (BUDHDEO; RAJAPAKSA, 2011).

2.3 Serotonina e Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina

A serotonina (5-HT) é um conhecido composto químico sintetizado a partir de um precursor, o triptofano, um aminoácido essencial, que é formado por um subconjunto de neurônios referidos como neurônios serotoninérgicos que estão presentes no sistema nervoso central, bem como em células enterocromafins no trato gastrointestinal (LEE, 2009; LI et al., 2014). Os neurônios que produzem 5-HT estão localizados em uma zona restrita do tronco cerebral e existem três populações reconhecidas (B1, B2, B3), que enviam os seus axônios para diferentes partes da matéria cinzenta da medula espinha (SŁAWIŃSKA et al., 2014). A maioria da é encontrada nos núcleos da rafe, a partir de três regiões principais, o globo pálido, e a rafe obscuris onde estão localizados os axônios dos neurônios B1 e B2 com terminações no corno anterior, e a rafe Magnus que enviam axônios tanto para o corno dorsal quanto para o ventral (SŁAWIŃSKA et al., 2014). Também é encontrada na linha média do rombencéfalo, e um número menor na formação reticular (GASPAR et al., 2003). O número total de neurônios serotoninérgicos é pequeno – por volta de 20.000 neurônios no rato (LIDOV; MOLLIVER, 1982; JACOBS; AZMITIA, 1992). Porém, os neurônios serotoninérgicos fornecem inervação relativamente mais densa para todas as áreas do cérebro e da medula espinhal, por uma extensa e difusa colaterização dos seus axônios (GASPAR et al., 2003).

Nos animais, a 5-HT participa na maior parte das funções biológicas, especialmente aquelas associadas com o circuito límbico e tronco cerebral (movimentos, respiração, reprodução e regulação da temperatura corporal) (AZMITIA, 2006). Desta forma, tem papel crítico no desenvolvimento do feto e do recém-nascido, influenciando a neurogênese, migração neuronal, e sinaptogênese no cérebro (LAUDER; KREBES, 1978; MAZER et al., 1997). Entretanto, a função primária dos neurônios serotoninérgicos no tronco encefálico é facilitar a saída dos impulsos motores durante os períodos de atividade motora tônica, como a manutenção postural, ou o controle de comportamento motores repetitivos que são mediadas pelo gerador de padrão central (CPG) da medula espinal, como a velocidade de locomoção (GHOSH; PEARSE, 2014). O CPG é um componente anatômico de locomoção composto de neurônios distribuídos dentro de uma rede neural na medula espinal toracolombar que aciona a saída de motoneurônios para gerar padrões rítmicos simples, como a locomoção (GHOSH; PEARSE, 2014).

A 5-HT tem sido reconhecida como um neuromodulador potente da atividade do CPG, e estudos como o de (SCHMIDT; JORDAN, 2000; PFLIEGER et al., 2002) fornecem evidências que o sistema serotoninérgico descendente modula reflexos medulares e funções motoras, além da coordenação dos membros posteriores através da ativação de receptores 5-HT específicos, aumentando a excitabilidade nos motoneurônios e interneurônios, além da geração de saída locomotora mediada pelo CPG. Os receptores de 5-HT têm sido classificados em sete subfamílias conhecidas, de 5-HT₁ a 5-HT₇, que se diferenciam por modificações pós-genômicas, tais como *splicing* ou edição de RNAm, resultando na identificação de pelo menos 30 subtipos de receptores 5-HT diferentes (RAYMOND et al., 2001).

O uso de 5-HT ou agonistas específicos do receptor 5-HT para estimular o CPG e induzir a locomoção ainda não está claro, pois não se sabe se essa abordagem poderia ser utilizada para a recuperação funcional prolongada, à luz de dessensibilização ou perda de respostas do receptor por estímulos ao longo do tempo (GHOSH; PEARSE, 2014). A injúria do sistema serotoninérgico tanto por manipulações genéticas ou farmacológicas no período neonatal em roedores resulta em atraso no desenvolvimento de camadas corticais, rompimento de padrões aferentes talamocorticais, e uma diminuição ou desorganização dos campos barril

no córtex somatossensorial (BLUE et al., 1991; BENNETT-CLARKE et al., 1994; PERSICO et al., 2001).

O desenvolvimento precoce no centro do tronco cerebral, a sua resposta a uma infinidade de estímulos e sua extensa ligação a todas as áreas do cérebro fornece a estrutura para 5-HT contribuir para o funcionamento holístico do cérebro (AZMITIA, 2006). A capacidade de modificar o sistema nervoso por um processo chamado neuroplasticidade torna a 5-HT adequada para servir como um regulador da homeostase no cérebro (AZMITIA, 2006). Dentre as alterações que acontecem nos animais, estão incluídas modificações nas propriedades morfológicas dos neurônios do córtex somatossensorial (LIAO; LEE, 2011; LEE; LEE, 2012) e atraso na ontogênese dos reflexos em animais submetidos a um tratamento neonatal com Inibidores Seletivos de Recaptação da Serotonina (ISRS) (LOPES DE SOUZA et al., 2004; DEIRÓ et al., 2008).

Foi observado que a administração de ISRS durante o período crítico de desenvolvimento em ratos pode alterar o circuito cerebral com manifestação na idade adulta (BORUE et al., 2007). Os ISRS pertencem a uma classe de medicamento que são utilizados para o tratamento de patologias relacionadas à fisiologia do neurotransmissor 5-HT (SPINKS; SPINKS, 2002), e recentemente vem sendo utilizado como primeira escolha farmacológica para o tratamento de transtornos depressivos (GLAZOVA et al., 2014). Todos ISRS tem o mesmo mecanismo de ação, e se diferenciam apenas na estrutura química (GLAZOVA et al., 2014). Esses fármacos aumentam a concentração de 5-HT na fenda sináptica através do bloqueio dos transportadores de 5-HT (SERT), que são responsáveis por mediar a recaptação da 5-HT (SPINKS; SPINKS, 2002; GLAZOVA et al., 2014). A utilização de ISRS durante a gestação ou infância pode agir sobre os neurônios que expressam os SERT e modificar suas propriedades no adulto através de alterações da sua transcrição específica ou de mudanças em sua expressão gênica (NARBOUX-NÊME et al., 2008). As mudanças causadas pela manipulação farmacológica através do uso de ISRS podem ser acompanhadas pela avaliação do desenvolvimento neurológico e motor representado por diferentes testes e análises.

2.4 Reflexos e Desenvolvimento Motor Normal

O sistema nervoso, juntamente com o sistema musculoesquelético, é responsável pela constante interação entre o ser vivo e o meio ambiente através de receptores sensíveis aos diferentes estímulos do meio externo e do meio interno (BERG, 1994). Ao se avaliar a integridade do sistema nervoso, é necessário verificar eventual comprometimento da sensibilidade, da motricidade ou das funções que refletem integração das informações derivadas de estímulos do meio ambiente, como por exemplo, o desenvolvimento de reflexos. O reflexo é uma resposta motora estereotipada do sistema nervoso central mediante os estímulos internos ou externos (ZEHR; STEIN, 1999), que pode ser inconsciente em resposta a situações de medo e estresse, agindo como um mecanismo protetor ou de sobrevivência (SWERDLOW; GEYER, 1998). O reflexo, resultante da função nervosa, é um comportamento provocado por estimulação preestabelecida e precisa, e que surge em períodos determinados durante o desenvolvimento ontogenético (FOX, 1965; SMART; DOBBING, 1971).

Os diversos reflexos sobrepõem-se uns aos outros, o que caracteriza a ocorrência simultânea de vários eventos do desenvolvimento do SNC, obedecendo a uma sequência predeterminada de acordo com a idade dos animais (FOX, 1965; SMART; DOBBING, 1971). Isto vale especialmente para aqueles que envolvem os movimentos da cabeça e influenciam a posição das patas, como a recuperação do decúbito e geotaxia negativa. Assim, alguns reflexos expressam atividades labirínticas e parecem estar relacionados com a sobrevivência do animal, como por exemplo, a alimentação e a conservação da temperatura (FOX, 1965). Algumas respostas reflexas, após serem confirmadas, persistem durante o período de rápido crescimento do encéfalo, ou são modificadas, adquirindo padrões comportamentais do adulto (ADLARD; DOBBING, 1971). Ao avançar da idade, cada reflexo se faz presente e sobrepõe-se ao anterior pré-existente, sendo uma exceção os reflexos primitivos como o de preensão palmar, que por serem primitivos desaparecem (ADLARD; DOBBING, 1971). Pode-se inferir, desta maneira, a existência de uma estreita correlação entre desenvolvimento estrutural e bioquímico do sistema nervoso e a ontogênese de reflexos (ADLARD; DOBBING, 1971)

A avaliação neurocomportamental do crescimento do rato pode ser investigada através de uma série de testes de reflexos sensório-motores desde o nascimento

até a lactação, sendo a segunda semana pós natal um período crucial para a maturação neurocomportamental no rato (FOX, 1965). Desta forma, os reflexos são indicadores sensíveis da adaptação do neonato a vida extra-uterina durante seu desenvolvimento, e a maturação dos vários reflexos revela a maturação relacionada a diferentes regiões do SNC (KUPERMAN, 2013).

Assim como os reflexos, o desenvolvimento do sistema motor e, conseqüentemente o início da atividade locomotora segue uma sequência temporal bem delimitada nos animais (MUIR, 2000). Durante o período neonatal, pode-se observar a trajetória desse desenvolvimento desde os primeiros movimentos até o estabelecimento de um padrão de locomoção típico de animais adultos.

O rastejar é o primeiro padrão de locomoção apresentado pelos filhotes e pode ser observado até a metade da segunda semana pós natal (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993). Após os 11 dias já é possível a locomoção com as quatro patas sustentando o peso do corpo (JAMON; CLARAC, 1998). Nessa fase há o início da transição entre o rastejar e o caminhar, na qual o ventre do animal perde o contato com o solo (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993). Uma rápida maturação dos membros posteriores nessa fase eleva substancialmente a capacidade exploratória do animal (BA e SERI, 1995).

Aos 14 dias acontecem os primeiros movimentos verticais (JAMON; CLARAC, 1998). Aos 15 dias, a ativação da musculatura dos membros posteriores é ativada, coincidindo com o ciclo da marcha. É a partir desses acontecimentos que se passa a considerar o ciclo de marcha adulta do animal (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993).

Embora já nas duas primeiras semanas o rato já apresente um padrão de marcha do animal adulto, ajustes ainda acontecem ao longo do tempo. Até os 21 dias, a coordenação e a ativação da musculatura é melhorada (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993; JAMON; CLARAC, 1998), permitindo a execução com desenvoltura de movimentos mais complexos (BA e SERI, 1995).

Durante o período de lactação, que corresponde as três primeiras semanas de vida acontece uma maturação e desenvolvimento importantes da locomoção do rato (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993). Esse período é considerado uma janela

de desenvolvimento na qual há mudanças referentes a plasticidade do SN acontecendo, e por ser um período crítico qualquer interferência pode influenciar a sequência temporal de como os filhotes se desenvolvem (DEIRÓ et al., 2004; BARROS et al., 2006). A injúria da aplicação do modelo de PC e a manipulação farmacológica pela aplicação de ISRS, são considerados fatores catalisadores de modificações no desenvolvimento da locomoção (MARCUIZZO et al., 2008; LEE; LEE, 2012; MARQUES et al., 2014), e por isso é um assunto levando em consideração para estudos envolvendo esses fatores.

3 JUSTIFICATIVA

A plasticidade fenotípica retrata a habilidade de um organismo alterar sua fisiologia e/ou morfologia em decorrência de sua interação com o ambiente. Estudos com inibidores seletivos de recaptação da serotonina observaram que o possível aumento nos níveis deste neurotransmissor na fase perinatal do desenvolvimento está associado com alterações na maturação de reflexos em roedores (DEIRÓ et al., 2008) e consequente modificação do padrão adulto da atividade locomotora (RIBAS et al., 2008). Mais recentemente, observamos que a inibição farmacológica neonatal da recaptação da serotonina protege as células neurais do stress oxidativo durante o desenvolvimento do cérebro (NOVÍO et al., 2011; MORETTI et al., 2012; SILVA et al., 2014). Esta interessante evidência sugere um papel protetor da atividade serotoninérgica sobre o desenvolvimento neural.

Nesse contexto, a gestão da paralisia cerebral é principalmente de apoio, nenhum dos tratamentos atuais oferecidos tentam corrigir o problema principal de uma lesão cerebral. Problemas neurológicos podem ser tratados alterando-se a plasticidade cerebral (BUDHDEO; RAJAPAKSA, 2011). Evidências sugerem que este é o mecanismo de ação dos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), inclusive no tratamento da depressão. Achados encorajadores de melhorias motoras em pacientes com AVC tratados com ISRS sugerem que a reorganização cortical que acontece durante o tratamento tem muito em comum com a aprendizagem motora, além da possibilidade de melhorias semelhantes na paralisia cerebral (BUDHDEO; RAJAPAKSA, 2011; CHOLLET et al., 2011). Mediante a essas observações pretende-se nesse estudo experimental avaliar o papel dos ISRS na maturação somática, sensório-motora, no desenvolvimento motor e na organização cortical de animais submetidos à paralisia cerebral experimental. Diante das evidências anteriormente referidas, a realização do trabalho foi justificada com o objetivo de encontrar respostas sobre o papel dos ISRS quando aplicadas precocemente no desenvolvimento neuromotor de animais induzidos à paralisia cerebral experimental.

4 HIPÓTESE

Os ratos com paralisia cerebral experimental submetidos à administração de fluoxetina terão um aparecimento precoce dos reflexos, melhores resultados nos testes que representam os marcos do desenvolvimento motor e um maior número de células neurais em relação aos ratos com paralisia cerebral que não fizeram uso da droga.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral:

Investigar em um modelo experimental de paralisia cerebral em ratos as repercussões da inibição farmacológica da recaptação da serotonina sobre a ontogênese dos reflexos e o desenvolvimento motor.

5.2 Objetivos Específicos:

Avaliar, em modelo experimental de PC sobre ratos submetidos ou não um tratamento neonatal com ISRS:

- a) O desenvolvimento murinométrico;
- b) A maturação das características físicas;
- c) Ontogênese dos reflexos
- d) O desenvolvimento da atividade locomotora;
- e) A coordenação motora;
- f) Análise histológica do córtex somatossensorial.

6 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi de caráter experimental com animais, realizado no laboratório de Fisiologia da Nutrição (LAFINNT) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco e no laboratório de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória (CAV-UFPE).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA/CCB-UFPE), processo nº0005/2015 (Anexo A). O manejo e os cuidados com os animais seguiram as normas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e as normas internacionais do *National Research Council of the National Academies* (EUA).

6.1 Animais:

Foram utilizados 64 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, provenientes de 20 ratas da colônia do Biotério de criação do Departamento de Nutrição. Os animais foram mantidos no Biotério de experimentação do Departamento de Nutrição da UFPE com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo claro-escuro invertido de 12/12 horas, alojados em gaiolas de polipropileno com dimensões 46x31x21cm (CxLxA), com livre acesso à água e alimentação.

Após a confirmação da gestação, através da técnica de esfregaço vaginal, as fêmeas foram alojadas em gaiolas individuais. Logo após o nascimento (P0) os filhotes foram ajustados para oito filhotes por ninhada, e permaneceram com as mães durante o período de lactação. A composição das ninhadas foram feitas seguindo os critérios de Bento-Santos et al., 2012. Os filhotes fêmeas foram utilizados para completar as ninhadas em casos de proles contendo menos de oito filhotes machos. Apenas os filhotes machos foram submetidos aos experimentos e obtenção de resultados.

6.2 Formação dos grupos experimentais:

Os filhotes foram distribuídos em quatro grupos, baseados na manipulação farmacológica e na indução à paralisia cerebral: grupo Salina Controle (C+S), n=13),

grupo Fluoxetina Controle (C+F, n=18), Salina/Anoxia Perinatal e Restrição Sensório-Motora (PC+S, n=17) e Fluoxetina/Anoxia Perinatal e Restrição Sensório-Motora (PC+F, n=16). As ninhadas foram subdivididas de forma que quatro animais pertenciam ao grupo submetido a paralisia cerebral experimental, totalizando oito animais por ninhada. Os animais foram mantidos com suas respectivas mães até os 21 dias de vida pós natal (P22), quando foi feito o desmame e separados em gaiolas individuais (3-4 animais por gaiola). A aplicação da droga foi mantida até o 21º dia de vida pós-natal, a restrição sensório motora mantida até o 28º dia e no 29º era realizada a retirada de tecidos histológicos dos animais após sua morte.

6.3 Manipulação farmacológica (Fluoxetina)

Um Inibidor Seletivo de Recaptação da Serotonina (ISRS), a Fluoxetina, foi utilizado durante o período de lactação (2º ao 21º dia de vida), com o objetivo de manipular o sistema serotoninérgico. O fármaco foi obtido na forma de cloridrato de fluoxetina (Bristol-USA®) e dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) para uma concentração de 10µl/g (SILVA et al., 2010). Foi utilizada uma concentração da droga de 10 mg/Kg de peso corporal (p.c.) do animal. No grupo controle foi utilizada uma concentração de 10ml/kg p.c. de solução de Cloreto de Sódio (NaCl) á 0,9%.

O tratamento foi administrado pela via Subcutânea (sc) na região dorsal da pele do animal consciente, diariamente, uma hora após o início do ciclo escuro (às 9h), horário que coincide com o pico de liberação de 5-HT no hipotálamo e potencializa a ação do fármaco, pois uma determinada dose de uma droga pode produzir diferentes efeitos quando aplicadas em diferentes horários ao longo do dia (MATEOS et al., 2009).

6.4 Anóxia e Restrição sensório-motora:

O modelo experimental de paralisia cerebral será baseado nos experimentos de (STRATA et al., 2004; COQ et al., 2008; MARCUZZO et al., 2008, 2010). Este modelo associa a anóxia perinatal a um modelo de restrição sensório-motora dos membros posteriores semelhante à falta de movimento ativa/espontânea ocorrida na PC. Os filhotes foram submetidos a dois episódios de anóxia pós-natal, no dia do nascimento (P0) e no primeiro dia de vida (P1). Os filhotes foram colocados dentro de uma câmara de vidro parcialmente imersa em água a 37 graus e expostos a nitrogênio (100%) a 9L/min por 12 minutos cada dia de exposição. (Figura 1) Após o

período de anóxia, os animais foram postos em temperatura e ar ambiente, e após recuperação de sua coloração rosada e respiração normal, foram recolocados em suas respectivas gaiolas com suas mães.

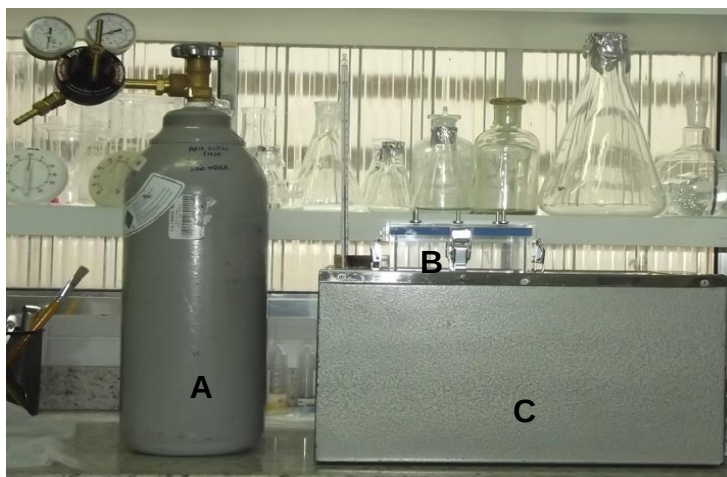


Figura 1: Materiais utilizados no procedimento de anóxia perinatal. A. Cilindro de Nitrogênio; B. Câmara de anóxia; C. Banho-maria.

A restrição sensório-motora foi realizada do segundo dia de vida pós-natal ao vigésimo-oitavo (P2 ao P28), durante 16 horas por dia (das 17h às 09h do dia seguinte), estando o animal livre para movimentação nas 8 horas restantes (das 09h às 17h). Para a restrição, foi utilizado uma órtese moldada com massa de epóxi, presa ao quadril do animal, estando o mesmo com as patas posteriores estendidas. Para fixar o quadril e membros posteriores do animal à órtese de epóxi, foram utilizadas fitas micropore e esparadrapo, de modo a causar o mínimo de ferimentos possível e não prejudicar a eliminação de urina e fezes do animal bem como os cuidados maternos (STRATA et al., 2004). (Figura 2)



Figura 2: Restrição sensório-motora. A: Modelo de epóxi utilizado nas 16 horas de restrição por dia; B: Filhote com a órtese presa ao quadril mantendo suas patas posteriores estendidas

e assegurando a eliminação de urina e fezes; C: Cuidados maternos não prejudicados para ambos os subgrupos.

Durante a retirada da órtese e fitas adesivas, alguns cuidados foram tomados, a fim de provocar o mínimo dano possível aos animais: 1) Uso de tesoura pequena e cotonete embebido em óleo mineral inodoro para facilitar a retirada do esparadrapo e fita micropore fixados à órtese, 2) Após retirada da órtese e fitas adesivas, um cotonete embebido em antisséptico foi utilizado nos locais onde apresentavam pequenas feridas, com propósito de facilitar cicatrização e reduzir o risco de infecções, 3) Nos animais mais velhos, não raramente era necessário realizar limpeza de fezes nas patas posteriores com auxílio de um algodão encharcado com água antes do uso do antisséptico.

6.5 Procedimentos

a) Avaliações murinométricas

Cada animal foi avaliado nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 pós natal às 14:00h, com auxílio de um paquímetro digital (JOMARCA®) quanto às seguintes medidas (SILVA, DA et al., 2005)

Comprimento da cauda (CC): O animal foi contido gentilmente com uma das mãos do pesquisador. Logo após, a cauda foi estirada horizontalmente na borda de uma mesa lisa e plana. Com uma caneta, foram feitas marcas na mesa, coincidentes com a extremidade e a base da cauda. Mediu-se então, a distância entre os pontos obtidos em milímetros (mm).

Eixo látero-lateral do crânio (ELLC): Considerou-se como referência a linha imaginária perpendicular ao eixo longitudinal do crânio, dividindo os pavilhões auriculares ao meio. O animal foi contido com uma das mãos, tendo a cabeça dele entre os dedos indicadores e polegar, medindo a distância em mm.

Eixo ântero-posterior do crânio (EAPC): A referência considerada para a medida do eixo ântero-posterior do crânio foi a linha média que vai da extremidade do focinho até o ponto de intersecção com outra linha perpendicular imaginária. Essa última passa tangencialmente às extremidades posteriores dos pavilhões auriculares. O animal foi contido com uma das mãos, mantendo a cabeça deste entre os dedos indicadores e polegar, medindo a distância em mm.

Eixo longitudinal (EL): O animal teve as regiões do dorso-anterior, dorso-posterior do corpo comprimidas e a cauda do animal de encontro a uma superfície plana (mesa). Em seguida, com uma caneta, foram feitas marcas na mesa, coincidentes com o focinho e a base da cauda do animal. Mediu-se então a distância em mm entre os pontos obtidos.

b) Peso e estudo da maturação das características físicas

O peso de cada filhote foi registrado diariamente um dia após o nascimento até os 21 dias, no momento da aplicação dos tratamentos, e posteriormente, a cada semana. O peso corporal dos animais foi registrado em uma balança Marte, modelos S-100, capacidade de 1 kg e sensibilidade de 0,01 g. Quanto à maturação dos caracteres físicos, elas foram analisadas diariamente às 14:00h e para cada animal, foi anotado o tempo em dias desde o nascimento até a maturação da característica física avaliada (SMART; DOBBING, 1971).

Abertura do pavilhão auditivo (APA): Os dois pavilhões, primitivamente dobrados ao nascimento sobre o orifício auricular, desfaziam a dobra, ficando livre e palpável pelo pesquisador.

Abertura do conduto auditivo (ACA): Os dois orifícios auriculares, primitivamente obliterados, abriam-se, tornando-se visível.

Erupção dos incisivos inferiores (EII): A erupção dos incisivos inferiores foi observada quando ocorreu o rompimento da gengiva com exposição incisal.

Erupção dos incisivos superiores (EIS): A erupção dos incisivos superiores foi observada quando ocorreu uma exposição incisal juntamente com o rompimento da gengiva.

Abertura dos olhos (AO): Ambos os olhos estavam abertos e com a presença de movimento palpebral.

c) Análise da ontogênese dos reflexos

Foi analisado diariamente em cada animal dos diferentes grupos, a partir do 1º ao 21º dia pós-natal, às 14h, o desenvolvimento dos seguintes reflexos: método modificado de (FOX, 1965; SMART; DOBBING, 1971). Para cada reflexo, o dia da consolidação foi considerado o primeiro dia da seqüência de três dias consecutivos de aparecimento completo da resposta reflexa esperada.

Preensão palmar: Foi realizada uma leve percussão na palma da pata dianteira esquerda de cada animal, utilizando um bastonete de metal, com aproximadamente 5 cm de comprimento e 1mm de diâmetro. A resposta foi considerada positiva, caso houvesse uma flexão rápida dos dedos após duas tentativas. Nessa avaliação, em especial, foi observado o desaparecimento do reflexo.

Recuperação de decúbito: O animal foi colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana. Foi considerada resposta positiva quando o ele girou o corpo e assumiu o decúbito ventral apoiado nas quatro patas, num período máximo de 10 segundos.

Colocação pelas vibrissas: O rato foi suspenso pela cauda de uma forma que suas vibrissas tocassem a borda de uma mesa. A resposta foi considerada positiva quando o animal colocou as patas anteriores sobre a mesa tentando caminhar, no tempo máximo de 10 segundos.

Aversão ao precipício: O animal foi colocado com as patas dianteiras sobre a borda de uma superfície plana e alta (mesa) de maneira a detectar o precipício. A resposta foi considerada positiva quando o animal, no tempo máximo de 10s, deslocou 45° do precipício, caracterizando a aversão.

Resposta ao susto: O rato foi submetido a um estampido agudo, produzido pela percussão de um bastão metálico sobre um recipiente (4,5 cm de diâmetro x 6 cm de altura) também metálico e oco, a uma distância aproximada de 10 cm do animal. A resposta foi considerada positiva, quando ocorreu uma simultânea e rápida retração com a imobilização involuntária do corpo do animal, característica de susto.

Geotaxia negativa: O animal foi colocado no centro de uma rampa de 45° de inclinação revestida com papel crepom, com a cabeça no sentido descendente. A resposta reflexa foi considerada positiva quando o animal, num período máximo de 10 segundos, voltar completamente, girando o corpo em aproximadamente 140°, posicionando a cabeça em sentido ascendente.

Queda livre: O rato foi segurado pelas quatro patas com o dorso voltado para baixo, a uma altura de 30 cm (uma régua de 30 cm, perpendicular ao plano serviu como guia). O animal foi solto e observado sua queda livre sobre um leito de algodão (30 x12 cm). A resposta foi considerada positiva quando o animal girou completamente o corpo, voltando o ventre para baixo, caindo na superfície apoiado sobre as quatro patas.

d) Registro e Análise da atividade locomotora

As filmagens ocorreram numa sala escura anexa ao biotério às 12h por ser no ciclo escuro do animal, pois é o momento que ele se encontra naturalmente em estado de vigília. A avaliação dos filhotes machos aconteceu no 8º, 14º, 17º e 21º dia de vida pós-natal. Estas datas foram escolhidas porque representam marcos no desenvolvimento da locomoção (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993). Foi utilizado um sistema de monitoramento em campo aberto circular (Ø1m) já instalado, delimitado por paredes de 30 cm de altura, com superfícies internas de cor preta e em sua base uma superfície de EVA (etil vinil acetato) também preta, de forma que seja obtido um maior contraste entre o animal e o campo. Uma câmera digital (VTR® 6638 – CCTV System) com sensor de infravermelho e LED de iluminação conectada a um computador é fixa ao teto e posicionada de forma vertical no centro do campo a fim de filmar o animal enquanto o mesmo se movimentar. A câmera encontra-se a uma distância de 2.65m do solo (ARAGÃO et al., 2011). Para as filmagens foi utilizado o software Ulead Video Studio®. A livre movimentação do animal foi registrada (5 minutos) e o filme foi convertido em quadros (454 quadros para cada filmagem de 5 minutos, com intervalo de tempo de aproximadamente 0,661s entre os quadros) utilizando o software CapturaSeqAVI®. Com o uso do software MATLAB® versão 7.0 foram realizadas as análises das imagens captadas, e posteriormente a extração de algumas grandezas físicas para serem obtidas informações acerca do comportamento do animal. Os parâmetros avaliados foram:

Distância Percorrida (m): Deslocamento (em metros, m) realizados pelo animal.

Velocidade Média de deslocamento (m/s): Relação do deslocamento pelo tempo em que o animal se locomoveu. Fórmula: $VM = \Delta S / \Delta T$, Onde VM = Velocidade Média (metros por segundo, m/s), ΔS = deslocamento total (m) e ΔT = tempo total de análise – tempo de parada (s);

Potência Média (mW): Potência que é produzida pelo período de deslocamento do animal. Fórmula: $PM = mV^2 / 2\Delta T$, Onde PM = Potência Média (miliwatts, mw), m = massa do animal (g), V = velocidade média (m/s) e ΔT = tempo total de análise – tempo de parada (s);

Energia Cinética: energia do animal pelo movimento realizado. Fórmula: $E = (mV^2)/2$, onde E = Energia (Joules, J), m = massa do animal (gramas, g) e V= Velocidade do animal (m/s);

Número de paradas (n): Número total de momentos que o animal realiza uma parada dentro do campo de avaliação.

Tempo parado (s): Representa o período de tempo que o animal permaneceu parado no campo de avaliação.

Relação de tempo total parado/Número de Paradas (s): Indica o tempo em que o animal ficou parado em cada parada.

Tempo nas áreas 1, 2 e 3 (s): O campo foi subdividido em 3 áreas circulares, sendo a área 1 a central, a área 2 a intermediária e a área 3 a periférica (Figura 3), cada área com o mesmo valor de raio (raio total do campo, R, de 50 cm, dividido em 3 partes, r). Para cada área foi realizado um cálculo diferente, sendo:

a)Fórmula $A1 = \pi.r^2$, onde π = letra grega “pi”, com valor de 3,14; r = raio da circunferência, de 16,67cm.

b)Fórmula $A2 = \pi (R1^2 - r^2)$, onde R1 = Raio do segundo círculo, que equivale a 2r.

c)Fórmula $A3 = \pi (R^2 - R1^2)$, onde R = Raio do campo.

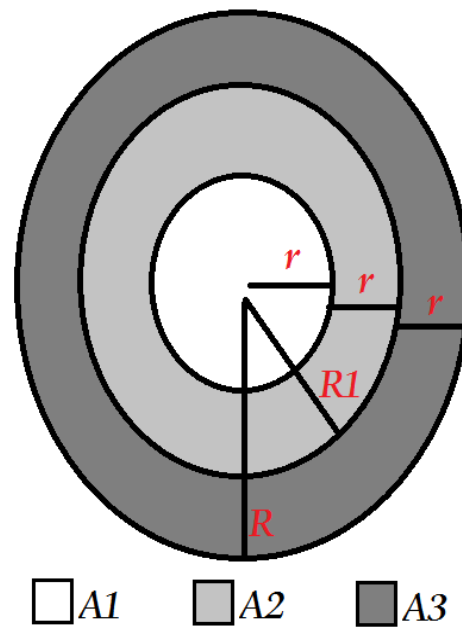


Figura 3: Esquema das áreas do campo aberto. R = raio do campo e da (0,5m); $R1$ = raio do segundo círculo; r = raio do círculo menor e de cada área. A1 = Área 1; A2 = Área 2; A3 = Área 3.

Após o registro a Atividade Locomotora os animais foram pesados em uma balança eletrônica digital com capacidade máxima de 1000 g e menor divisão de 0,01g.

e) Avaliação da coordenação (Rotarod)

No 29º dia foi realizado o teste do Rotarod, que permite avaliar a coordenação motora, o equilíbrio e a força muscular (PAZAITI et al., 2009). Neste teste, o animal é colocado no rotarod para ratos (Insight), sobre uma haste texturizada de 60 mm de diâmetro e 75 mm de comprimento, em rotação, a uma velocidade de 25 rpm com 5 tentativas e intervalos de 2 minutos entre elas (MARQUES et al., 2014). A duração máxima de cada tentativa foi de 3 minutos. O intervalo entre as quedas foi registrado através da cronometragem do tempo que o animal leva para cair. Inicialmente os animais foram habituados ao aparato por 2 minutos em uma rotação de 16 rpm e em seguida, foram iniciadas as sessões de avaliação.



Figura 4: Animal realizando teste de coordenação motora ao 29º dia no Rotarod (Insight®).

f) Análise histológica e morfométrica

Em P29 os animais foram anestesiados (n = 18) com quetamina e xilazina (50 mg / kg, ip). Em seguida, foi realizada a perfusão transcardíaca com 150ml de salina tamponada em tampão fosfato e depois com 200ml paraformoldeído a 4%. Após a perfusão, os cérebros foram removidos e pós-fixados no em paraformaldeído a 4% overnight e em seguida imerso em sacarose por 24 a 48 horas para depois ser armazenado em freezer -80 graus para posterior criosecção. Secções cerebrais coronais (20 um) foram obtidos utilizando um criostato (Leica®) e coradas utilizando o método de Hematoxilina e Eosina. Em seguida, as imagens da área de representação do membro inferior na área S1, identificados através de coordenadas estereotóxica (-2,28 mm de bregma) (PAXINOS; WATSON, 2006) e foram capturadas e digitalizadas (em 40x para contagem de células na camada V). Os campos microscópicos foram obtidos através de microscópio óptico OLYMPUS modelo U-CMAD-2 (objetiva 20 X) acoplado a um programa para captação de imagens. Para contagem das células foi utilizado o software MENSURIN PRO versão 3.2 (Jean-François Madre-Amiens, França). Para cada rato, neurônios e células gliais foram contados em 20 campos em cada corte (dez no hemisfério esquerdo e dez na direita). Os neurônios foram identificados pela seu tamanho geralmente maior e de contorno não esférico (UYLINGS et al., 1999; KONOPASKE et al., 2007). (Figura 5) As células da glia foram identificados pelo seu aspecto esférico. O índice glia-neurônio foi calculado como a proporção de células da glia por neurônios em cada campo, foi usada a fim de melhor analisar os resultados (adaptado de Marcuzzo et al., 2010).

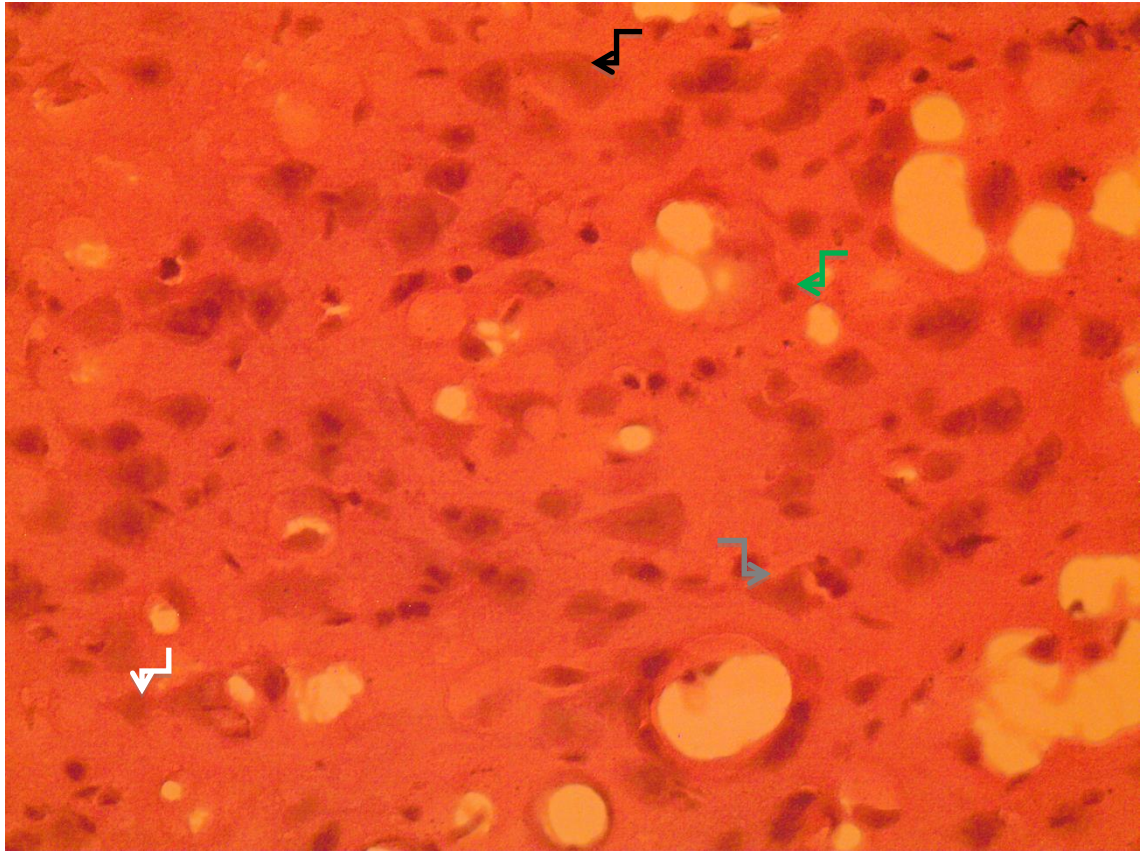


Figura 5: Imagem digitalizada representativa de secções coradas com Hematoxilina e Eosina, coradas mostrando a camada V da área de representação das patas posteriores no córtex somatossensorial de um animal do grupo Controle Salina. Células neuronais grandes (seta preta), células neuronais média (seta cinza), células neuronais pequenas (seta branca), células da glia (seta verde). Escala 40um.

6.6 Medidas de desfecho e definição das variáveis:

6.6.1 Variáveis independentes:

De Interesse: Manipulação farmacológica (aplicação da fluoxetina e solução salina) e paralisia cerebral experimental.

De Controle: Idade e peso das gestantes e sexo dos filhotes.

6.6.2 Variáveis dependentes

Desfecho primário: Ontogênese dos reflexos e desenvolvimento motor

Desfechos secundários: Avaliações murinométricas; Maturação das características físicas; Avaliação de força e coordenação e Análise histológica do córtex somatosensorial.

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados quanto à distribuição normal de probabilidade e quanto à homogeneidade das variâncias. Foi utilizado o software Graphpad Prism5®. Entre as variáveis quantitativas contínuas, foi realizado o teste de aderência de Kolmogorov-Sminorv, quando a distribuição foi normal, utilizou-se o teste paramétrico Anova Two Way para comparação de médias dos fatores paralisia cerebral experimental e manipulação farmacológica, seguida do pós teste de *Bonferroni*. Não evidenciada distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-wallis, com o pós teste de Duncann. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média, sendo o nível de significância utilizado de 5% ($p < 0,05$).

8 RESULTADOS

Os resultados deste estudo serão apresentados em forma de artigo original.

Artigo Original – Neonatal administration of fluoxetine increases somatic damage and neuromotors of rats submitted to an experimental model of cerebral palsy.

Este artigo (APÊNDICE A) foi elaborado segundo os objetivos, metodologias e resultados do presente estudo e será submetido à Revista *Behavioural Brain Research* (qualis A2 para a área 21 da CAPES, fator de impacto 3.002).

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que a paralisia cerebral e a inibição farmacológica neonatal diminuem a atividade locomotora, prejudica a coordenação motora, aumenta as células da glia e diminui os neurônios do córtex somato sensorial em animais. A exposição a drogas durante a lactação em ratos pode ser considerada um modelo para estudo do abuso de drogas em humanos (XU et al., 2004; THOMPSON et al., 2010). O presente estudo confirma que o desenvolvimento do sistema neuromúsculo-esquelético é sensível a paralisia cerebral e a inibição farmacológica neonatal, de forma a atrasar esse desenvolvimento. Além disso, demonstra que a exposição a fluoxetina, inibidor seletivo da recaptação da serotonina, agrava os danos neuromotores nos animais submetidos a paralisia cerebral.

REFERÊNCIAS

- ADLARD, B.; DOBBING, J. Elevated acetylcholinesterase activity in adult rat brain after undernutrition in early life. **Brain Research**, v. 9, n. 30, p. 198–9, 1971.
- ARAGÃO, R. DA S.; RODRIGUES, M. A. B.; BARROS, K. M. F. T. DE; et al. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents-A reproducibility study. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 216–221, 2011.
- ARAÚJO, L. Profile of cerebral palsy in a rehabilitation hospital in Brazil. , v. 49, n. 4, p. 242–249, 2012.
- AZMITIA, E. C. Serotonin and Brain: Evolution, Neuroplasticity, and Homeostasis. **International Review of Neurobiology**, v. 77, n. July 2015, p. 31–56, 2006.
- BAX M, GOLDSTEIN M, R. P. Proposed definition and classification of cerebral palsy. **Dev Med Child Neurol.**, v. 47, n. 8, p. 571–6, 2005.
- BENNETT-CLARKE, C. A; HANKIN, M. H.; LESLIE, M. J.; CHIAIA, N. L.; RHOADES, R. W. Patterning of the neocortical projections from the raphe nuclei in perinatal rats: investigation of potential organizational mechanisms. **The Journal of comparative neurology**, v. 348, n. 2, p. 277–90, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7814692>>. .
- BENTO-SANTOS, A.; SANTOS, J.; SILVA, A.; et al. Critérios para escolha da amostra em experimentos com ratos Wistar. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 1, n. 1, p. 121–129, 2012.
- BERG, B. **Child Neurology: a clinical manual**. 2nd ed. ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1994.
- BERG, W. D. J. VAN DE; BLOKLAND, A.; CUELLO, A. C.; SCHMITZ, C.; VREULS, W. Perinatal asphyxia results in changes in presynaptic bouton number in striatum and cerebral cortex — a stereological and behavioral analysis. , v. 20, p. 71–82, 2000.
- BLUE, M.; ERZURUMLU, R.; JHAVERI, S. A comparison of pattern formation by thalamocortical and serotonergic afferents in the rat barrel field cortex. **Cerebral**

Cortex, v. 1, n. 5, p. 380–9, 1991.

BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 6, p. 881–897, 2010. Elsevier Inc. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2010.03.005>>. .

BORUE, X.; CHEN, J.; CONDRON, B. G. Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 6, p. 341–347, 2007.

BUDHDEO, S.; RAJAPAKSA, S. Functional recovery in cerebral palsy may be potentiated by administration of selective serotonin reuptake inhibitors. **Medical Hypotheses**, v. 77, n. 3, p. 386–388, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2011.05.026>>. .

CHOLLET, F.; TARDY, J.; ALBUCHER, J. F.; et al. Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): A randomised placebo-controlled trial. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 2, p. 123–130, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em:
<[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70314-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70314-8)>. .

COLVER, A.; FAIRHURST, C.; PHAROAH, P. O. D. Cerebral palsy. **The Lancet**, v. 383, n. 9924, p. 1240–1249, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em:
<[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61835-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61835-8)>. .

COQ, J. O.; STRATA, F.; RUSSIER, M.; et al. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: Implications for cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p. 95–108, 2008. Elsevier Inc. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.006>>. .

DEIRÓ, T. C. B. D. J.; CARVALHO, J.; NASCIMENTO, E. DO; et al. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 66, n. 3 B, p. 736–740, 2008.

EKLIND, S.; MALLARD, C.; ARVIDSSON, P.; HAGBERG, H. Lipopolysaccharide induces both a primary and a secondary phase of sensitization in the developing rat

brain. **Pediatric Research**, v. 58, n. 1, p. 112–116, 2005.

FERRAZ, C. R. A.; ARAÚJO, M. V. DE; CARREIRO, L. R. R. Inclusão de crianças com Síndrome de Down e paralisia cerebral no ensino fundamental I: comparação dos relatos de mães e professores. **Revista Brasileira de Educação Especial**, v. 16, n. 3, p. 397–414, 2010. Disponível em:
<<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79952306351&partnerID=tZOtx3y1>>. .

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Animal Behaviour**, v. 13, n. 2–3, p. 234–IN5, 1965. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003347265900412>>. .

GALINDO, L. C. M.; BARROS, M. DA L. D.; PINHEIRO, I. L.; et al. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 46, p. 76–81, 2015. International Society for Developmental Neuroscience. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.07.004>>. .

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 12, p. 1002–1012, 2003.

GHOSH, M.; PEARSE, D. D. The role of the serotonergic system in locomotor recovery after spinal cord injury. **Frontiers in neural circuits**, v. 8, n. February, p. 151, 2014. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4321350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

GLAZOVA, N. Y.; MERCHIEVA, S. A.; VOLODINA, M. A.; et al. Effects of neonatal fluvoxamine administration on the physical development and activity of the serotonergic system in white rats. **Acta Naturae**, v. 6, n. 22, p. 98–105, 2014.

HALES, C.; BARKER, D. The thrifty phenotype hypothesis. **British medical bulletin**, v. 60, n. 5, p. 5–20, 2001.

HIMMELMANN, K.; AHLIN, K.; JACOBSSON, B.; CANS, C.; THORSEN, P. Risk

factors for cerebral palsy in children born at term. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 90, n. 10, p. 1070–1081, 2011.

ITO, J. ICHI; ARAKI, A.; TANAKA, H.; et al. Muscle histopathology in spastic cerebral palsy. **Brain and Development**, v. 18, n. 4, p. 299–303, 1996.

JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiological reviews**, v. 72, n. 1, p. 165–229, 1992.

JAMON, M.; CLARAC, F. Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. **Behavioral Neuroscience**, v. 112, n. 5, p. 1218–1228, 1998.

JOHNSTON, M. V.; FERRIERO, D. M.; VANNUCCI, S. J.; HAGBERG, H. Models of Cerebral Palsy. **Journal of Child Neurology**, v. 20, n. 12, p. 984–987, 2005.
Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/08830738050200121001>>.

.

JONES, M. W.; MORGAN, E.; SHELTON, J. E.; THOROGOOD, C. Cerebral Palsy: Introduction and Diagnosis (Part I). **Journal of Pediatric Health Care**, v. 21, n. 3, p. 146–152, 2007.

KIASATDOLATABADI, A.; LOTFIBAKHSHAIESH, N.; YAZDANKHAH, M.; et al. The Role of Stem Cells in the Treatment of Cerebral Palsy: a Review. **Molecular Neurobiology**, p. 1–10, 2016. Molecular Neurobiology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0030-0>>.

KOLB, B.; GIBB, R. Brain plasticity and behaviour in the developing brain. **J Can Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 20, n. 265–276, 2011.

KOLB, B.; GIBB, R.; ROBINSON, T. E. Brain Plasticity and Behavior. **Current Directions in Psychological Science**, v. 12, n. 1, p. 2–5, 2003.

KOMAN, L. A.; SMITH, B. P.; SHILT, J. S. Cerebral palsy. **Lancet**, v. 363, n. 9421, p. 1619–1631, 2004.

KONOPASKE, G. T.; DORPH-PETERSEN, K.-A.; PIERRI, J. N.; et al. Effect of chronic exposure to antipsychotic medication on cell numbers in the parietal cortex of macaque monkeys. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 6, p. 1216–1223,

2007.

KRIGGER, K. W. Cerebral Palsy : An Overview. **American Family Physician**, v. 73, n. 1, p. 91–100, 2006.

KUPERMAN, A. S. Effects of acrylamide on the central nervous system of the rat.

The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2013. Disponível em:

<<http://jpet.aspetjournals.org/content/123/3/180.long%5Cnpapers://c3e98fae-7b9a-4503-a691-ac4d4e660aec/Paper/p4295>>. .

LACERDA, D. C.; FERRAZ-PEREIRA, K. N.; TERÁCIO, A.; RODRIGUES, BÁRBARA JUACY GUZMAN QUEVEDO, OMAR A , MANHÃES-DE-CASTRO, R.; TOSCANO, A. E. Orofacial functions in experimental models of cerebral palsy: a systematic review. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 4, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28160523>>. .

LACERDA, D. C.; FERRAZ-PEREIRA, K. N.; VISCO, D. B.; et al. Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats. **Physiology and Behavior**, v. 173, p. 69–78, 2017. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.043>>. .

LAUDER, J.; KREBES, H. Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. **Developmental Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 15–30, 1978.

LEE, L. J. Neonatal Fluoxetine Exposure Affects the Neuronal Structure in the Somatosensory Cortex and Somatosensory-Related Behaviors in Adolescent Rats. **Neurotoxicity Research**, v. 15, n. 3, p. 212–223, 2009.

LEE, L. J.; LEE, L. J. H. Neonatal fluoxetine exposure alters motor performances of adolescent rats. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 8, p. 1122–1132, 2012.

LI, H. J.; JOHNSTON, B.; AIELLO, D.; et al. Distinct cellular origins for serotonin-expressing and enterochromaffin- like cells in the gastric corpus. **Gastroenterology**, v. 146, n. 3, p. 754–764.e3, 2014. Elsevier, Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.048>>. .

LIAO, C. C.; LEE, L. J. Neonatal fluoxetine exposure affects the action potential

properties and dendritic development in cortical subplate neurons of rats.

Toxicology Letters, v. 207, n. 3, p. 314–321, 2011. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.028>>. .

LIDOV, H. G. W.; MOLLIVER, M. E. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: Ascending pathways and terminal fields. **Brain Research Bulletin**, v. 8, n. 4, p. 389–430, 1982.

LIPTON, S. A; KATER, S. B. Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth , plastid and survival. **Trends Neurosci.**, v. 12, n. 7, p. 265–270, 1989. Disponível em: <file:///d:/okujeni/literature/papers/Lipton89_.pdf>. .

LISOVSKA, N.; DARIBAYEV, Z.; LISOVSKYY, Y.; et al. Pathogenesis of cerebral palsy through the prism of immune regulation of nervous tissue homeostasis: literature review. **Child's Nervous System**, v. 32, n. 11, p. 2111–2117, 2016. Child's Nervous System. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00381-016-3245-5>>. .

LOPES DE SOUZA, S.; NOGUEIRA, M. I.; JESUS DEIRÓ, T. C. B. DE; et al. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. **Physiology and Behavior**, v. 82, n. 2–3, p. 375–379, 2004.

MACHADO, V.; PIMENTEL, S.; PINTO, F.; NONA, J. Perinatal ischemic stroke: a five-year retrospective study in a level-III maternity. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 1, p. 65–71, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25993071>>. .

MANABAT, C.; HAN, B. H.; WENDLAND, M.; et al. Reperfusion differentially induces caspase-3 activation in ischemic core and penumbra after stroke in immature brain. **Stroke**, v. 34, n. 1, p. 207–213, 2003.

MARBINI, A.; FERRARI, A; CIONI, G.; et al. Immunohistochemical study of muscle biopsy in children with cerebral palsy. **Brain & development**, v. 24, n. 2, p. 63–66, 2002.

MARCUZZO, S.; DUTRA, M. F.; STIGGER, F.; et al. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. **Brain and Development**, v. 32, n. 4, p. 323–331, 2010.

MARCUZZO, S.; FERREIRA DUTRA, M.; STIGGER, F.; et al. Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: Walking pattern and soleus quantitative histology. **Brain Research**, v. 1222, p. 129–140, 2008.

MARQUES, M. R.; STIGGER, F.; SEGABINAZI, E.; et al. Beneficial effects of early environmental enrichment on motor development and spinal cord plasticity in a rat model of cerebral palsy. **Behavioural Brain Research**, v. 263, p. 149–157, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.007>>. .

MATEOS, S. S.; SÁNCHEZ, C. L.; PAREDES, S. D.; BARRIGA, C.; RODRÍGUEZ, A. B. Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 104, n. 1, p. 52–59, 2009.

MAZER, C.; MUNEEYIRCI, J.; TAHENY, K.; et al. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: A possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. **Brain Research**, v. 760, n. 1–2, p. 68–73, 1997.

MCINTYRE, S.; TAITZ, D.; KEOGH, J.; et al. A systematic review of risk factors for cerebral palsy in children born at term in developed countries. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 55, n. 6, p. 499–508, 2013.

MEIRELES, A. L. F.; MARQUES, M. R.; SEGABINAZI, E.; et al. Association of environmental enrichment and locomotor stimulation in a rodent model of cerebral palsy: Insights of biological mechanisms. **Brain Research Bulletin**, v. 128, p. 58–67, 2017. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.001>>. .

MORETTI, M.; COLLA, A.; OLIVEIRA BALEN, G. DE; et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 3, p. 331–340, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.11.009>>. .

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral**

Reviews, v. 17, n. 1, p. 91–128, 1993.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, p. 471–83, 2002.

NARBOUX-NÊME, N.; PAVONE, L. M.; AVALLONE, L.; ZHUANG, X.; GASPAR, P. Serotonin transporter transgenic (SERT^{cre}) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). **Neuropharmacology**, v. 55, n. 6, p. 994–1005, 2008.

NOVACHEK, T. F.; GAGE, J. R. Orthopedic management of spasticity in cerebral palsy. **Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery**, v. 23, n. 9, p. 1015–1031, 2007.

NOVÍO, S.; NÚÑEZ, M. J.; AMIGO, G.; FREIRE-GARABAL, M. Effects of Fluoxetine on the Oxidative Status of Peripheral Blood Leucocytes of Restraint-Stressed Mice. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 109, n. 5, p. 365–371, 2011.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain on Stereotaxic Coordinates**. 6th ed. ed. Academic Press, 2006.

PAZAITI, A.; SOUBASI, V.; SPANDOU, E.; et al. Evaluation of Long-Lasting Sensorimotor Consequences following Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Rats: The Neuroprotective Role of MgSO₄. **Neonatology**, v. 95, n. 1, p. 33–40, 2009.

PERSICO, A. M.; MENGUAL, E.; MOESSNER, R.; et al. Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 17, p. 6862–6873, 2001.

PFLIEGER, J.-F.; CLARAC, F.; VINAY, L. Postural modifications and neuronal excitability changes induced by a short-term serotonin depletion during neonatal development in the rat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 12, p. 5108–17, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077206>>. .

RAYMOND, J. R.; MUKHIN, Y. V.; GELASCO, A.; et al. Multiplicity of mechanisms of

serotonin receptor signal transduction. **Pharmacology & therapeutics**, v. 92, n. 2–3, p. 179–212, 2001.

REBEL, M. F.; RODRIGUES, R. F.; CORRÊA, C. L. Prognóstico Motor E Perspectivas Atuais Na Paralisia Cerebral Motor Prognosis and Current Perspectives in. , v. 20, n. 2, p. 342–350, 2010.

RENOLLEAU, S.; AGGOUN-ZOUAOU, D.; BEN-ARI, Y.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 29, n. 7, p. 1454–60; discussion 1461, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660403>>. .

RIBAS, V. R.; ANICETO, H. K. R.; MARTINS, H. A. D. L.; et al. Neonatal administration of fluoxetine did not alter the anxiety indicators, but decreased the locomotor activity in adult rats in the elevated plusmazeAdministração neonatal de fluoxetina não alterou os indicadores de ansiedade, mas diminuiu a atividade l. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 66, n. May, p. 844–847, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=0004-282X20080006&lng=pt&nrm=iso>. .

RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 3, p. 511–533, 2000.

RICE, J.; VANNUCCI, R.; BRIERLEY, J. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Annals of Neurology**, v. 9, n. 2, p. 131–141, 1981.

ROSENBAUM, P.; MORRIS, C.; BAXTER, P.; et al. The Definition and Classification of Cerebral Palsy Contents Foreword Historical Perspective Definition and Classification Document. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 49, n. 109, p. 1–44, 2007.

ROUSSET, C. I.; KASSEM, J.; AUBERT, A.; et al. Maternal exposure to lipopolysaccharide leads to transient motor dysfunction in neonatal rats. **Developmental Neuroscience**, v. 35, n. 2–3, p. 172–181, 2013.

SCHMIDT, B. J.; JORDAN, L. M. The role of serotonin in reflex modulation and

locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 53, n. 5, p. 689–710, 2000.

SILVA, A. I.; GALINDO, L. C. M.; NASCIMENTO, L.; et al. Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 92, n. 4, p. 330–337, 2014.

SILVA, C. M. DA; GONÇALVES, L.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; NOGUEIRA, M. I. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. **Neuroscience Letters**, v. 483, n. 3, p. 179–183, 2010.

SILVA, H. J. DA; OLIVEIRA CAVALCANTI MARINHO, S. M.; TOSCANO MENESES DA SILVA, A. E.; et al. Protocol of Mensuration to Avaliation of Indicators of Somatic Development of Wistar Rats. **International Journal of Morphology**, v. 23, n. 3, p. 227–230, 2005.

SILVA, K. O. G. DA; PEREIRA, S. DA C.; PORTOVEDO, M.; et al. Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 52, p. 38–45, 2016.

SŁAWIŃSKA, U.; MIAZGA, K.; JORDAN, L. M. The role of serotonin in the control of locomotor movements and strategies for restoring locomotion after spinal cord injury. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 74, n. 2, p. 172–187, 2014.

SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research**, v. 28, n. 1, p. 85–95, 1971.

SPINKS, D.; SPINKS, G. Serotonin reuptake inhibition: an update on current research strategies. **Current Medical Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 799–810, 2002.

STEARNS, S.; JONG, G. DE; NEWMAN, B. The effects of phenotypic plasticity on genetic correlations. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 4, p. 122–126, 1991.

STIGGER, F.; FELIZZOLA, A. L. D. S.; KRONBAUER, G. A.; et al. Effects of fetal exposure to lipopolysaccharide, perinatal anoxia and sensorimotor restriction on

motor skills and musculoskeletal tissue: Implications for an animal model of cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 228, n. 2, p. 183–191, 2011. Elsevier Inc.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.001>>. .

STIGGER, F.; NASCIMENTO, P. S. DO; DUTRA, M. F.; et al. Treadmill training induces plasticity in spinal motoneurons and sciatic nerve after sensorimotor restriction during early postnatal period: New insights into the clinical approach for children with cerebral palsy. **International Journal of Developmental**

Neuroscience, v. 29, n. 8, p. 833–838, 2011. International Society for Developmental Neuroscience. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.09.002>>. .

STRATA, F.; COQ, J. O.; BYL, N.; MERZENICH, M. M. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: Implications for a rodent model of cerebral palsy. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 141–156, 2004.

SWERDLOW, N.; GEYER, M. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia.

Schizophrenia Bulletin, v. 24, n. 2, p. 285–301, 1998.

UYLINGS, H.; ZILLES, K.; RAJKOWSKA, G. Optimal Staining Methods for Delineation of Cortical Areas and Neuron Counts in Human Brains. **NeuroImage**, v. 9, n. 4, p. 439–445, 1999.

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

ZEHR, E. P.; STEIN, R. B. What functions do reflexes serve during human locomotion? **Progress in Neurobiology**, v. 58, n. 2, p. 185–205, 1999.

APÊNDICE A- NEONATAL ADMINISTRATION OF FLUOXETINE INCREASES SOMATIC DAMAGE AND NEUROMOTORS OF RATS SUBMITTED TO AN EXPERIMENTAL MODEL OF CEREBRAL PALSY.

Autores: André Teracio Bezerra de Moraes¹, Raul Manhães de Castro², Diego Cabral Lacerda³, Sabrina Pereira¹, Gleyciele Leandro de Albuquerque¹, Ana Elisa Toscano⁴.

¹ Programa de pós graduação em Fisioterapia – Mestrado –Universidade Federal de Pernambuco – Brasil.

²Departamento de Nutrição – Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco.

³Programa de pós graduação em Nutrição – Doutorado – Universidade Federal de Pernambuco – Brasil.

⁴Núcleo de Enfermagem – Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco.

ABSTRACT:

Scenario: Cerebral palsy (CP) is a neurological disorder that changes functions such as movements and posture, and slows somatic growth. Serotonin (5-HT) acts as an important neuromodulator in the central and peripheral nervous system, altering the construction and plasticity of neural circuits and presenting as a factor that may alter some deleterious effects of CP.

Objectives: To evaluate the use of fluoxetine on somatic maturation and neuromotor development in rats submitted to or not to the experimental model of cerebral palsy.

Methods: In each litter, 8 animals were divided into four groups: 1- Saline + Control, 2- Fluoxetine +Control, 3-Perinatal anoxia and Sensory Motor Restriction /Saline, 4-Perinatal anoxia and Sensory Motor Restriction / Fluoxetine. Perinatal anoxia occurred at P0 and P1, the sensory motor restriction from P2 to P28 and the application of Fluoxetine or saline (10mg / kg) each occurred from the 2nd to the 21st postnatal day. Somatic growth was evaluated on alternate days, and the development of locomotor activity was evaluated by filming the animals in an open field on alternate days that represent milestones of locomotion development. The evaluation of the coordination was performed by the rotarod test on the

29th day, in which the animals were also euthanized and the brain tissue was removed for histological analysis of the somatosensory cortex.

Results: Fluoxetine was associated with lower somatic growth in experimental animals. The CP + F group obtained smaller results in the distance, Power and speed of the locomotor activity parameters, lower coordination results, lower number of neurons and greater number of glial cells in the neural tissue.

Conclusion: Neonatal pharmacological inhibition exacerbates effects on somatic, motor, and neural plasticity of the somatosensory cortex in experimental animals submitted to cerebral palsy.

KEY WORDS: Perinatal asphyxia; Restriction Motor sensory; Serotonin; SSRI; Reflex ontogenesis; Motor development; Locomotion; Somatosensory cortex plasticity.

INTRODUCTION

CP comprises a group of movement and posture disorders that cause functional limitation and are attributed to non-progressive disorders that occur in the fetal central nervous system or the developing child (ROSENBAUM et al., 2007). The CP affects 2 to 3.5 per 1,000 births, being considered the most common cause of chronic motor dysfunction in childhood (YEARGIN-ALLOPOPP et al., 2008). In underdeveloped or developing countries, however, the incidence is higher, it is estimated that in Brazil there are 17,000 new cases per year (ARAÚJO, 2012).

This disease may be associated with deficits in somatosensory perception and / or changes in the normal development of the somatosensory system (BAX M, GOLDSTEIN M, 2005). Most patients with CP exhibit increased reflexes, hypertonicity and characteristic gait in scissors, may also present atrophy and muscular weakness (Krigiger, 2006). These patients have an inability to control motor functions due to a reduction in the number of effective motor units, which leads to abnormal muscular control (KOMAN et al., 2004). This may directly affect exploratory ability, learning, and independence (JONES et al., 2007). Deficits in motor and cognitive functions have been associated with changes in numbers and in the organization of synapses, especially in the cerebral cortex and (BERG et al., 2000). Changes in movement patterns cause changes in the somatosensory cortex representation, therefore changes in brain histology in CP models should be carefully studied (MARCUIZZO et al., 2010).

Phenotypic plasticity depicts the ability of an organism to alter its physiology and/ or morphology as a result of its interaction with the environment (Stearns et al., 1991). In studies with selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), the possible increase in levels of this neurotransmitter in the perinatal phase of development delays the maturation of reflexes in rodents (DEIRÓ et al., 2008), and impairs motor activities (RIBAS et al., 2008). More recently, however, it has been observed that the neonatal pharmacological inhibition of serotonin reuptake protects neural cells from oxidative stress during brain development (NOVÍO et al., 2011; MORETTI et al., 2012). This interesting evidence suggests a protective role of serotonergic activity on neural development.

The therapeutic management of cerebral palsy is mainly a follow-up of the sequelae and none of the current treatments offered try to correct the main problem of a brain injury. However, altered brain plasticity is one of the mechanisms for treating neurological problems. This is the mechanism of action of SSRIs, including the treatment of depression (BUDHDEO; RAJAPAKSA, 2011). In the present study, the use of SSRIs in the treatment of cerebral palsy (Stroke et al., 2011) suggests the possibility of similar improvements in cerebral palsy (BUDHDEO; RAJAPAKSA, 2011). Neonatal SSRIs treatment may reverse the decrease in 5-HT concentration in the frontal and parietal cortex seen in an experimental model of cerebral palsy (KANNAN et al., 2011).

SSRIs in increasing brain levels of serotonin may play a beneficial role when applied early in the neuromotor development of individuals already affected by cerebral palsy. Therefore, the present study evaluated the effects of neonatal pharmacological inhibition of serotonin reuptake on somatic maturation, reflex ontogenesis, development of locomotor activity, coordination and somatosensory cortex morphology of animals submitted to experimental cerebral palsy.

METHODS

The research was experimental with animals, carried out in the Laboratory of Nutrition Physiology (LAFINNT) of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco and in the Laboratory of Nutrition, Physical Activity and Phenotypic Plasticity of the Academic Center of Vitória (CAV-UFPE).

Sixty male *Rattus Norvegicus Albinus* Wistar rats were kept in the vivarium with a temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, inverted light-dark cycle of 12/12 hours, with free access to water and feed.

The pups were divided into four groups, based on pharmacological manipulation and induction of cerebral palsy: Saline Control (S + C) group, $n = 13$), Fluoxetine Control group (F + C, $n = 18$), Saline / Anoxia Perinatal And Sensory Motor Restriction (CP + S, $n = 17$) and Fluoxetine / Perinatal Anoxia and Sensory Motor Restriction (PC + F, $n = 16$). The litters were subdivided so that four animals belonged to the group submitted to experimental cerebral palsy, totalizing eight animals per litter. The animals were kept with their respective mothers until the 21 days postnatal life (P22), when they were weaned and separated in individual cages (3-4 animals per cage). The application of the drug was maintained until the 21st day postnatal life, the motor sensory restraint was maintained until the 28th day and in the 29th was carried out the removal of histological tissues from the animals after their death.

Pharmacological manipulation (Fluoxetine)

A Selective Serotonin Reuptake Inhibitor (SSRI), Fluoxetine, was used during the lactation period (2nd to 21st day of life), with the aim of manipulating the serotonergic system. The drug was obtained as fluoxetine hydrochloride (Bristol-USA®) and dissolved in saline solution (NaCl 0.9%) at a concentration of $10 \mu\text{l} / \text{g}$ (SILVA et al., 2010). A concentration of the drug of $10 \text{ mg} / \text{kg}$ body weight (p.c.) of the animal was used. In the control group a concentration of $10 \text{ ml} / \text{kg}$ p.c. of sodium chloride (NaCl) solution at 0.9%. Treatment was given subcutaneously (sc) in the dorsal region of the conscious animal's skin, daily, one hour after the start of the dark cycle (at 9am).

Anoxia and Sensory motor Restriction:

The experimental model of cerebral palsy will be based on the experiments of (Silva et al., 2004, SILQ et al., 2008). This model associates perinatal anoxia with a model of sensory motor restraint of the hind limbs similar to the lack of active or spontaneous movement occurred in the CP. The pups were submitted to two episodes of postnatal anoxia, on the day of birth (P0) and on the first day of life (P1).

The sensorimotor restriction was performed from the second day of postnatal life to the twenty-eighth (P2 to P28), for 16 hours a day, and the animal was free to move in the remaining 8 hours.

Murinometric evaluations

Each animal was evaluated on days 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 post-natal at 14:00, using a digital caliper (JOMARCA®) for the following measurements (SILVA, DA et al. 2005).

Tail Length (TL): The animal was gently contained with one of the researcher's hands. Soon after, the tail was drawn horizontally and with a pen, marks were made on the table, matching the end and the base of the tail. The distance between the points obtained in millimeters (mm) was then measured.

Lateral-axis of the skull (LAS): The imaginary line perpendicular to the longitudinal axis of the skull was considered as reference, dividing the auricular pavilions in the middle. The animal was restrained with one hand, with his head between index fingers and thumb, measuring the distance in mm.

Anteroposterior axis of the skull (AAS): The reference considered was the midline from the end of the muzzle to the point of intersection with another imaginary perpendicular line. The latter passes tangentially to the posterior extremities of the ear-cups. The animal was contained with one hand, keeping the head between the index fingers and thumb, measuring the distance in mm.

Longitudinal axis (LA): The animal had the dorsum-anterior, dorsum-posterior regions of the body compressed and the animal's tail against a flat surface (table). Then, with a pen, marks were made on the table, matching the muzzle and the base

of the animal's tail. The distance in mm between the obtained points was then measured.

Registration and analysis of locomotor activity

The evaluation of the pups took place on the 8th, 14th, 17th and 21st days of postnatal life. These dates were chosen because they represent milestones in the development of locomotion (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993). An already installed circular open field monitoring system (Ø1m), delimited by walls 30 cm high, with black inner surfaces and at its base an EVA (ethyl vinyl acetate) surface also black, so that Greater contrast between the animal and the field. A digital camera (VTR® 6638 - CCTV System) with infrared sensor and LED illumination connected to a computer is fixed to the ceiling and positioned vertically in the center of the field to film the animal as it moves. The camera is at a distance of 2.65m from the ground. For the filming, the Pico2000® software was used (ARAGÃO et al., 2011). The free movement of the animal was recorded (5 minutes) and the film was converted into frames (454 frames for each 5 minute shoot, with a time interval of approximately 0.661s between the frames) using CapturaSeqAVI® software. With the use of MATLAB® software version 7.0 the analyzes of the captured images were carried out, and later the extraction of some physical quantities to obtain information about the behavior of the animal. The parameters evaluated were:

Distance Traveled (m): Displacement (in meters, m) performed by the animal.

Velocity Average displacement (m / s): Relation of displacement by the time the animal moved. (M / s), ΔS = total displacement (m) and ΔT = total time of analysis - stopping time (s);

Average Power (mW): Power that is produced by the period of displacement of the animal. (M / s), m = mass of the animal (g), V = mean velocity (m / s) and ΔT = total time of analysis - time of Stop (s);

Kinetic energy: energy of the animal by the movement performed. Formula: $E = (mV^2) / 2$, where E = Energy (Joules, J), m = mass of the animal (grams, g) and V = velocity of the animal (m / s);

Number of stops (n): Total number of moments that the animal stops in the evaluation field.

Stopped time (sec): Represents the length of time the animal remained stationary in the evaluation field.

Total stop time / Number of stops (sec): Indicates the time the animal was stopped at each stop.

Time in areas 1, 2 and 3 (s): The field was subdivided into 3 circular areas, with area 1 to center, area 2 to intermediate and area 3 to peripheral.

After recording the Locomotive Activity the animals were weighed in a digital electronic scale with a maximum capacity of 1000 g and smaller division of 0.01g.

Evaluation of coordination (Rotarod)

On the 29th day the RotaRod test was performed. In this test, the animal is placed in the rat rotarod (Insight), on a textured rod 60 mm in diameter and 75 mm in length, rotating at a speed of 25 rpm (MARQUES et al., 2014). (5 trials with interval of 2 minutes between them). The maximum duration of each trial was 3 minutes. The interval between falls was recorded by timing the animal's time to fall. Initially the animals were habituated to the apparatus for 2 minutes at a rotation of 16 rpm and then the evaluation sessions were started.

Histological and morphometric analysis

In P29 the animals were anesthetized (n = 18) with ketamine and xylazine (50 mg / kg, ip). Transcardiac perfusion was then performed with 150 ml of buffered saline in phosphate buffer and then with 200 ml of 4% paraformoldehyde. After perfusion, the brains were removed and post-fixed in 4% paraformaldehyde overnight and then dipped in sucrose for 24 to 48 hours and then stored in a freezer -80 degrees for subsequent cryosection. Coronal cerebral sections (20 μ m) were obtained using a cryostat (Leica®) and stained using the Hematoxylin and Eosin method. Then, the images of the lower limb representation area in the S1 area, identified by stereotactic coordinates (-2.28 mm bregma) (PAXINOS; WATSON, 2006) were captured and scanned (at 40x for cell counts in the Layer V). Microscopic fields were obtained through an OLYMPUS optical microscope model U-CMAD-2 (20 X objective) coupled to a program for image capture. The MENSURIN PRO version 3.2 software (Jean-François Madre-Amiens, France) was used to count the cells. For each rat, neurons and glial cells were counted in 20 fields in each cut (ten in the left

hemisphere and ten in the right). Neurons were identified by their generally larger size and non-spherical contour (UYLINGS et al., 1999; KONOPASKE et al., 2007). (Figure 3) Glia cells were identified by their spherical appearance. The glia-neuron index was calculated as the ratio of glia cells by neurons in each field, was used in order to better analyze the results (adapted from Marcuzzo et al., 2010).

STATISTICAL ANALYSIS

The obtained data were analyzed for the normal distribution of probability and for the homogeneity of the variances. Graphpad Prism5® software was used. Among the continuous quantitative variables, the Kolmogorov-Smirnov adhesion test was performed, when the distribution was normal, the Anova Two Way parametric test was used to compare means of the experimental cerebral palsy and pharmacological manipulation, followed by post-test of Bonferroni. The Kruskal-wallis non-parametric test was used, with Duncann's post-test. The results are expressed as mean and standard error of the mean, and the significance level used was 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

Body weight

The animals that underwent pharmacological manipulation when compared to those who did not suffer (S+C vs F+C) presented lower weight ($p < 0.05$) from the 19th day. When compared to the S+C group, the animals submitted to the CP induction model (S+C vs CP+S) presented lower weight from the 16th day and between the rats that suffered the two interventions (CP+S vs. CP+F), a lower weight was found in the animals of the CP+F group from the 15th day (Figure 1).

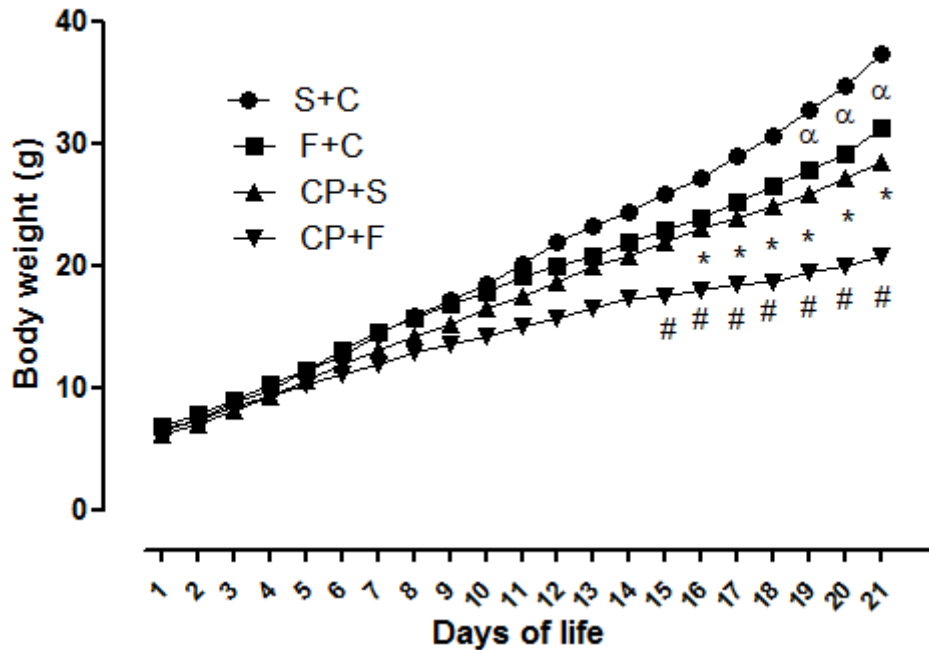


Figure 1: Body weight evolution of the S + C (n = 13), F + C (n = 14), CP + S (n = 17) and CP + F (n = 13) groups over the course of days. Data were expressed as mean $\pm$ SEM. (α = S + C vs F + C; * = S + C vs CP + S; # = CP + S vs CP + F) $p < 0.05$.

Somatic Development and Maturation of Physical Characteristics

In all the parameters measured, the animals of the groups submitted to CP, CP+S and CP+F had smaller measurements, and the CP+F group presented the smallest measurements in all parameters evaluated. In the tail length (TL), the difference between the growth ($p < 0.05$) of the groups S+C vs F+C and CP+S vs CP+F appeared for the first time only on the 18th day, while growth of the CP+S group was lower ($p < 0.05$) than the S+C group from the 9th day. (Figure 2) In the measurements of the Longitudinal Axis (LA) (Figure 2) and the Lateral Lateral Skull Axis (LLA) (Figure 4), the CP+S control group had a decrease ($p < 0.05$) To the S+C group, from the 15th day. Also from the 15th day, there was a decrease ($p < 0.05$) in the CP+F group compared to the CP+S group. However, in the anterioposterior axis of the skull (AAS) a decrease ($p < 0.05$) in the growth of the measures of the CP+S group compared to the S+C group was observed from the 18th day. (Figure 3) In the analysis of maturation of physical characteristics, no statistical difference was found ($p > 0.05$)(Table 1).

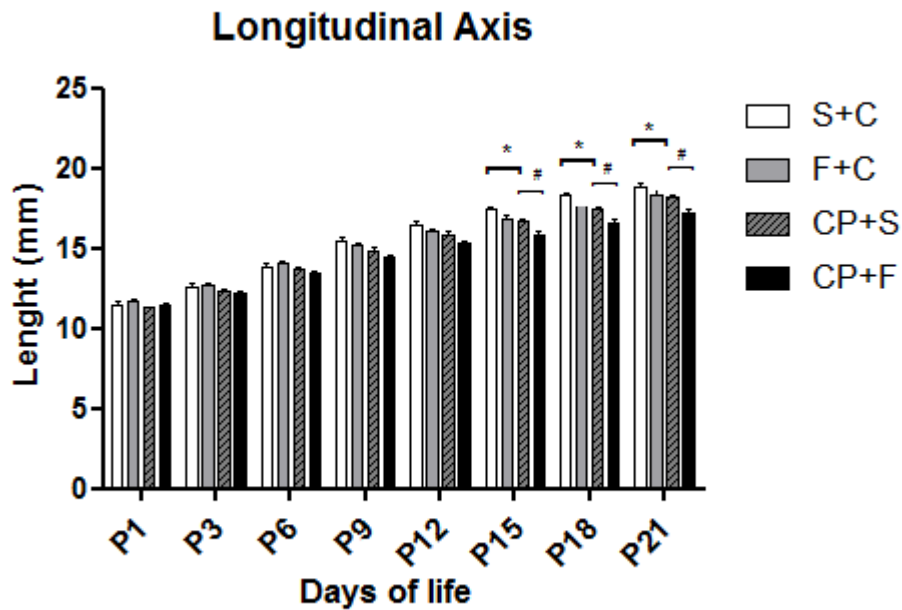


Figure 2:

Longitudinal Axis evolution of the S + C (n = 13), F + C (n = 14), CP + S (n = 17) and CP + F (n = 13) groups over the course of days. Data were expressed as mean $\pm$ SEM. (α = S + C vs F + C; * = S + C vs CP + S; # = CP + S vs CP + F) p < 0.05.

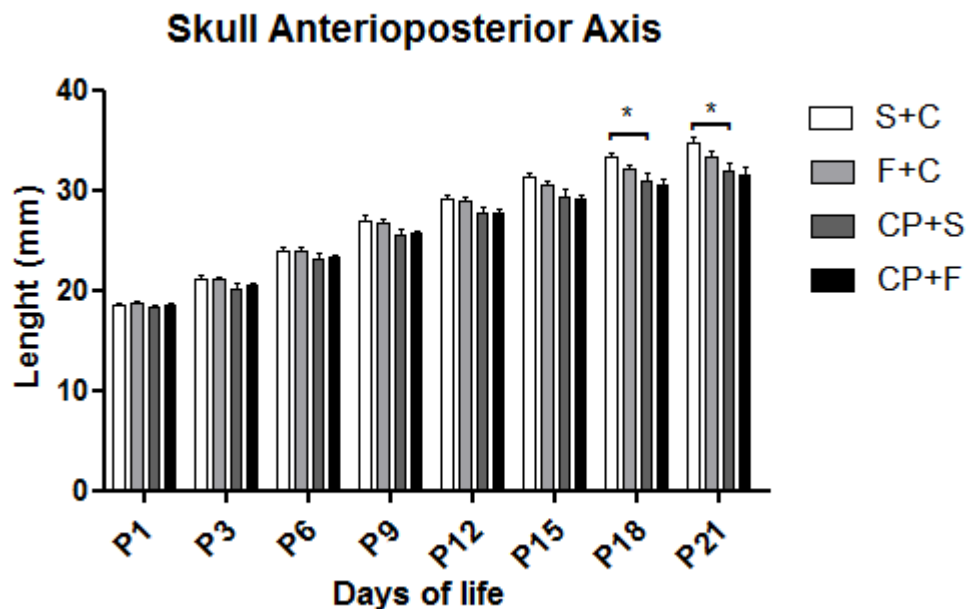


Figure 3: Skull Anterioposterior Axis evolution of the S + C (n = 13), F + C (n = 14), CP + S (n = 17) and CP + F (n = 13) groups over the course of days. Data were expressed as mean $\pm$ SEM. (α = S + C vs F + C; * = S + C vs CP + S; # = CP + S vs CP + F) p < 0.05.

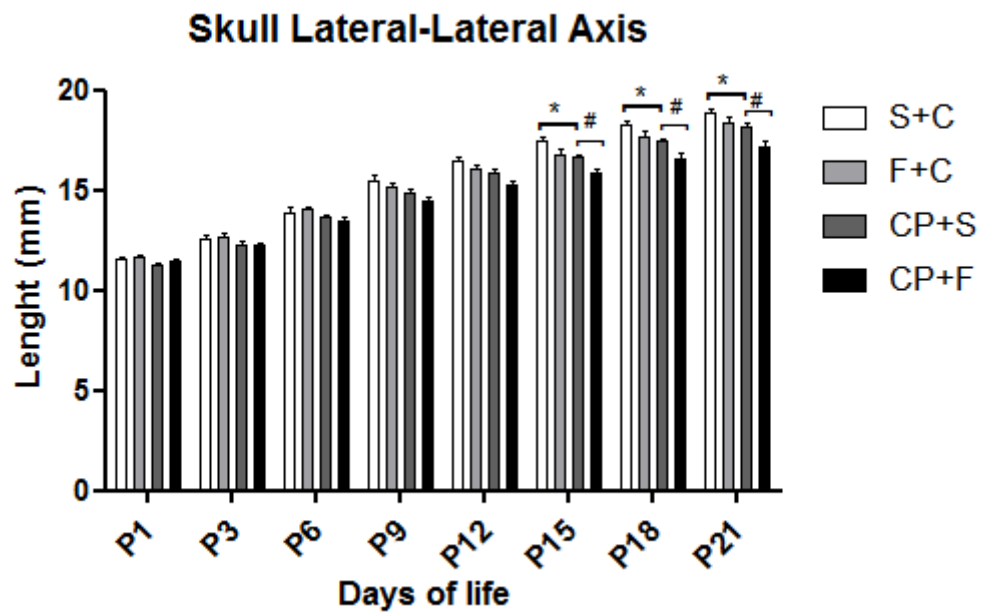


Figure 4: Skull Lateral-Lateral Axis evolution of the S + C (n = 13), F + C (n = 14), CP + S (n = 17) and CP + F (n = 13) groups over the course of days. Data were expressed as mean $\pm$ SEM. (α = S + C vs F + C; * = S + C vs CP + S; # = CP + S vs CP + F) p < 0.05.

Physical characteristics

	Groups							
	S + C		F + C		CP + S		CP + F	
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	Median	Min-Max	Median	Min-Max
Ear unfolding	3	2-4	3	2-3	3	2-3	3	2-3
Auditory conduct opening	13	11-16	13	12-15	14	12-16	15	12-17
Eye opening	14	13-16	15	13-17	15	14-16	16	15-17
lower incisor eruption	10	8-11	10	9-12	11	10-12	11	10-12
Superior incisor eruption	10	9-11	9,5	7-12	10	9-11	10	9-11

Table 1: Physical characteristics maturation day. Data were expressed as mean $\pm$ SEM. (α = S + C vs F+ C; * = S + C vs CP + S; # = CP + S vs CP + F) $p < 0.05$.

Reflexs Ontogeny

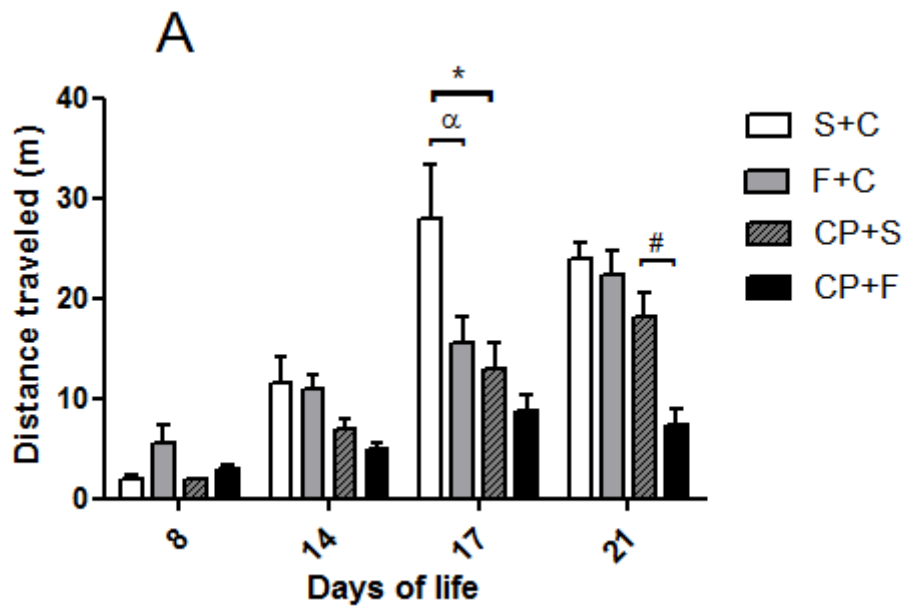
Palmar grip reflexes, as well as recovery reflexes, were the first to mature, followed by placement by vibrissae and aversion to the cliff, which did not differ between groups. The other reflexes that appear late, from day 11 had variations between the groups. The Free Fall and Negative Geotaxia reflexes delayed ($p < 0.05$) in the comparison of the PC + S group to the C + S group.

	Groups							
	C + S		C + F		PC + S		PC + F	
	Median	Mín-Máx	Median	Mín-Máx	Median	Mín-Máx	Median	Mín-Máx
Palmar grasp	6	3 – 8	5	3-6	6	3-10	5	3-9
Righting	4	2-7	3	2-6	4	2-7	4	2-6
Cliff avoidance	7	4-8	7	4-9	7	4-10	7	5-10
Vibrissa placing	6	3-8	7	5-9	6	4-8	5	3-9
Free Fail righting ^b	11	10-14	12	9-15	14	11-15	15	11-16
Negative Geotaxis ^b	14	11-19	17,5	14-22	22*	14-22*	22*	20-22*
Auditory startle	13	11-15	13	12-14	13	13-15	14	12-17

Table 2: Reflex ontogeny.Data were expressed as mean $\pm$ SEM. (α = S + C vs F+ C; * = S + C vs CP + S; # = CP + S vs CP + F) p <0.05.

Locomotor Activity Analysis

This analysis was divided by the days of filming (8th, 14th, 17th and 21st days). The total distance (m), the mean velocity (m / s), and the mean power (mW) were lower and the standing time (s) was higher ($p < 0.05$) on the 17th day for the C + F groups And PC + S compared to the C + S group. Meanwhile, on the 21st day, a similar decrease ($p < 0.05$) was observed in the PC + F group compared to the PC + S group (Figure 6, A, B, C and D).



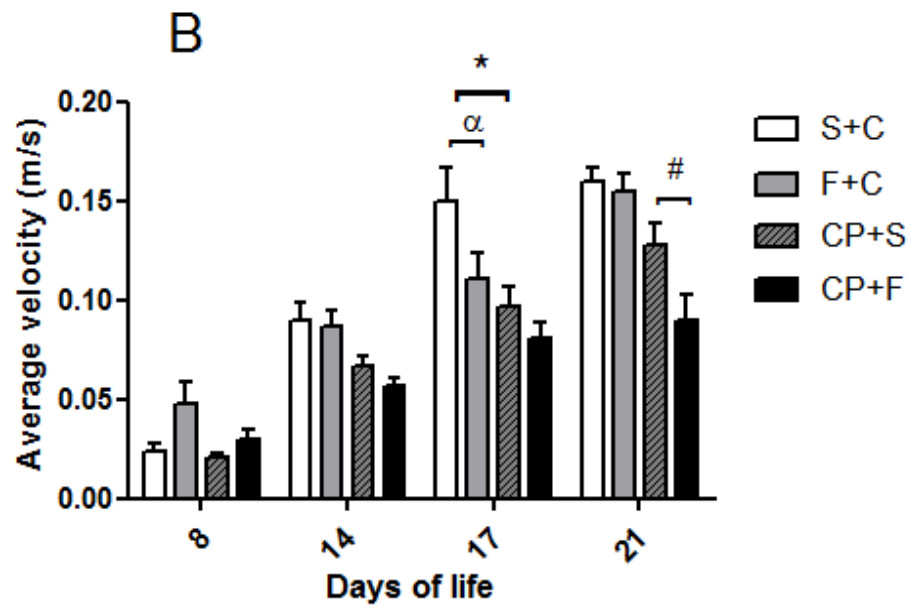
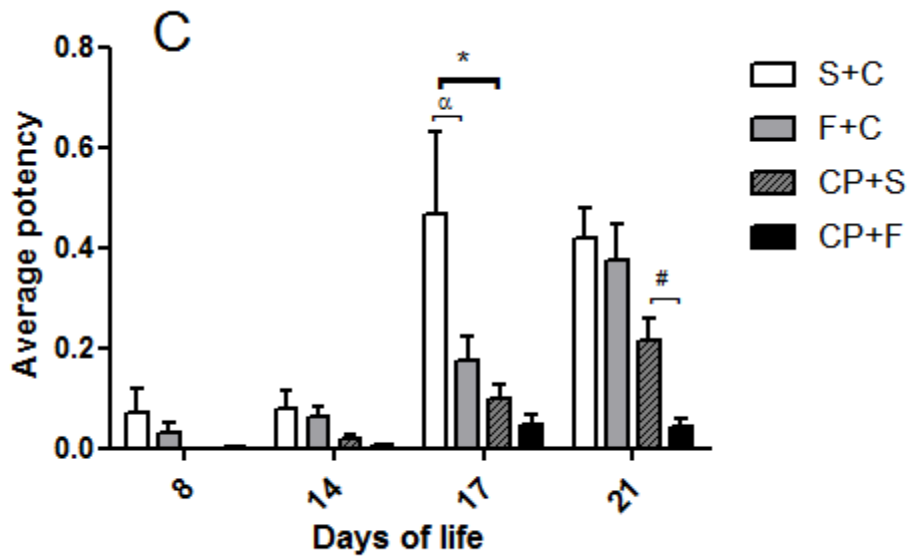


Figure 5: Locomotor Activities parameters. A= Total Distance (m); B= Average Velocity (m/s). Data were expressed as mean $\pm$ SEM. (α = S + C vs F+ C; * = S + C vs CP + S; # = CP + S vs CP + F) $p < 0.05$.



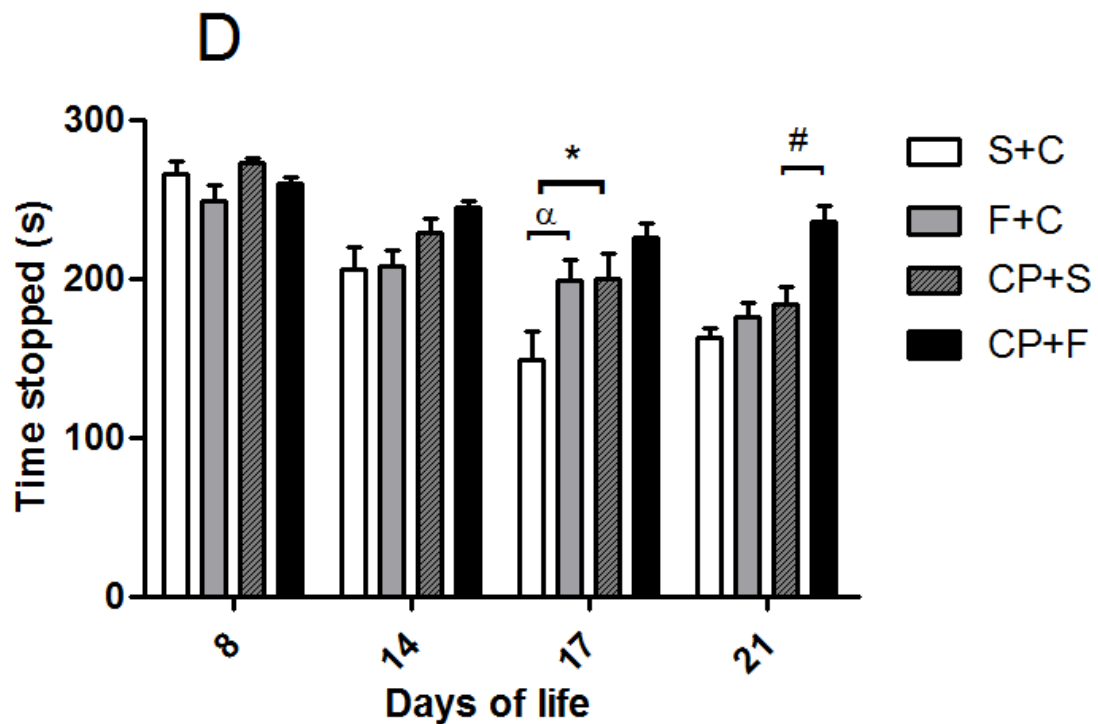


Figure 6: Locomotor Activities parameters. C= Average Potency (mW); D= Time stopped (s). Data were expressed as mean $\pm$ SEM. (α = S + C vs F+ C; * = S + C vs CP + S; # = CP + S vs CP + F) $p < 0.05$.

In relation of kinetic energy average was in the 17^o Day, a decrease ($p < 0.05$) of the average energy of the groups C+F= $2,8 \cdot 10^{-8}$ and the PC+S = $1,56 \cdot 10^{-8}$ related to the group C+S = $4,92 \cdot 10^{-6}$, and at the 21^o Day was observed a decrease ($p < 0.05$) in the energy of the group PC+F= $7,25 \cdot 10^{-9}$ compared to the group CP+S= $3,31 \cdot 10^{-8}$. As for the time that the animals spent in each of the areas, there were no differences in this time in areas 1 and 2 between the groups. However, in area 3 the animals of the group (PC + S) spent less time in this area in relation to the animals of the group (C + S) at 17 days. (Figure 7) Regarding the parameters number of stops and time stopped / number of stops there was no difference between groups ($p < 0.05$).

Coordination

The drop latency was lower ($p < 0.05$) in the comparison of the C + F group with the C + S group in all the attempts. It was also lower ($p < 0.05$) in the CP + S group compared to the C + S group in the first, second and fifth trials. There were no differences between the CP + S and CP + F groups in the coordination test. (Figure 8)

Morphological and morphometric analysis of the S1 area

The plasticity analysis of the somatosensory cortex was made by the histological analysis of the S1 area of this region. (Figure 7) The group C+F ($N = 237 \pm 7.46$) and the group CP+S ($N = 137 \pm 4.8$) had a decrease ($p < 0.05$) in the number of neurons compared to the C + S group ($N = 268.50 \pm 16.64$). The CP + F group ($N = 113.5 \pm 6.06$) had no differences in the number of neurons ($p < 0.05$) compared to the CP + S group. In relation to the glial cells, the C + F (855.40 ± 27.18) and CP + S (879.80 ± 21.07) groups had an increase ($p < 0.05$) in these cells compared to the C + S group ($N = 672.75 \pm 35.23$). As the CP + F group (1285.50) had an increase ($p < 0.05$) in the glia cells compared to the CP + S group. The C + F ($N = 4.09 \pm 0.34$) and CP + S ($N = 7.34 \pm 0.30$) groups had a decrease ($p < 0.05$) in the index in relation to the Cells index of glial Neurons / (G / N) C + S group ($N = 2.73 \pm 0.22$). The PC + F group ($N = 13.13 \pm 0.94$) had a decrease ($p < 0.05$) in the N / G index compared to the PC + S group. (Table 3)

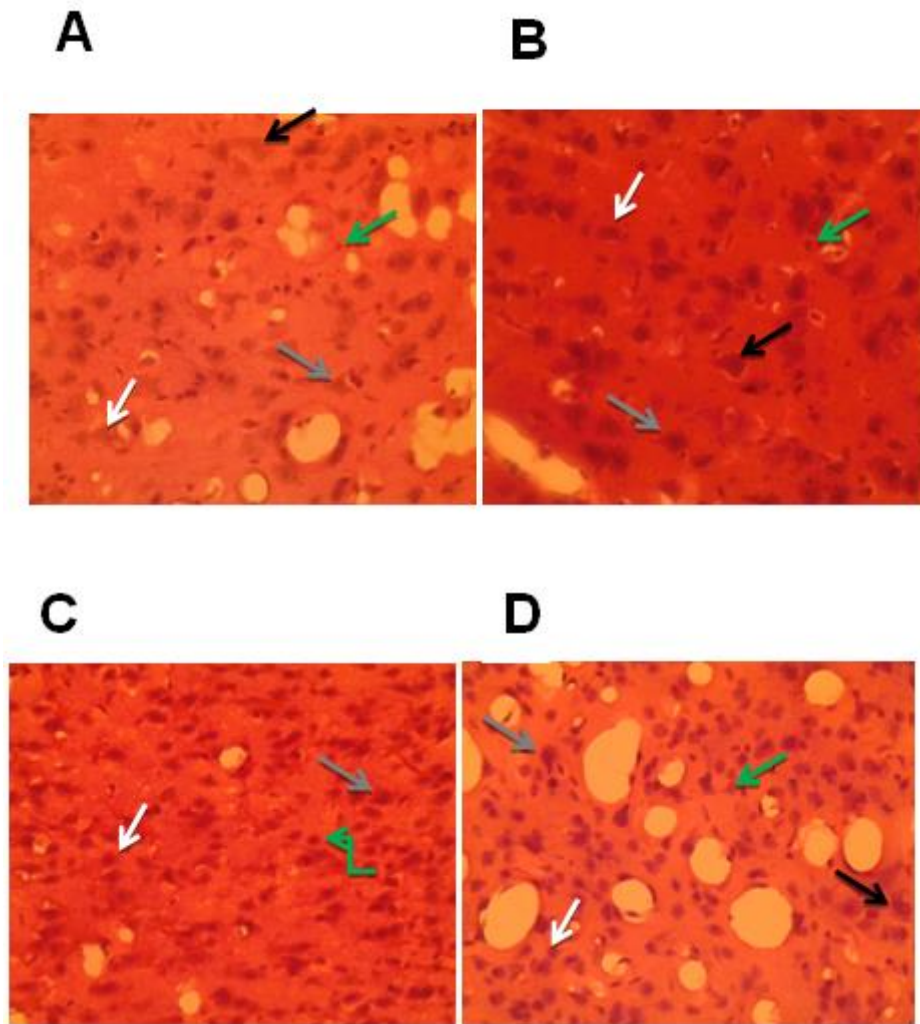


Figure 7: Scanned images representative of sections stained with Hematoxylin and Eosin, showing the layer V of the posterior paw representation area in the somatosensory cortex of the groups S+C (A), F+C (B), CP+S (C) e CP+F(D). Big neuronal cells (Black arrow), medium neuronal cells (gray arrow), small neuronal cells (white arrow), glial cells (green arrow). Scale 40um.

Experimental Groups	C + S (N = 4)	C + F (N = 5)	CP + S (N = 5)	CP + F (N = 4)	p
Number of neurons (N)	268.50 ± 16.64	237 ± 7.46 α	137.20 ± 4.80*	113.50 ± 6.06	P < 0.001
Number of glial cells (G)	672.75 ± 35.23	855.40 ± 27.18 α	879.80 ± 21.07* #	1285.50 ± 35.72	P < 0.001
Index G/N	2.73 ± 0.22	4.09 ± 0.34	7.34 ± 0.30* #	13.13 ± 0.94	P < 0.001

Table 3: Number of neurons, glial cells and neurons/glial cells index of rats from Saline Control (S+C; n=4), Fluoxetine Control (F+C; n=5), Cerebral Palsy Saline (CP+S; n=5) and Cerebral Palsy Fluoxetine (CP+F; n=4). Data was expressed as mean ± SEM. Two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test.* = C+S vs. PC+S (P<0.01); α = C+S vs. C+F (P<0.01); # = PC+S vs. PC+F (P<0.01).

Discussion

We evaluated the effects of pharmacological manipulation in rats submitted or not to cerebral palsy in many parameters related to the neuromotor system. Both experimental cerebral palsy such neonatal pharmacological manipulation influenced the development of this system.

In addition, the association of these manipulations seems to exacerbate the damage on body weight, somatic development, locomotor activity and the number of somatosensory cortex glial cells in rats submitted to experimental CP that using neonatal fluoxetine, thus counteracting hypothesis previously thought.

The reduction of body weight in rats submitted to neonatal pharmacological manipulation may be associated with the actions that the inhibition of serotonin reuptake causes in food intake. Similar to other studies, there was a reduction in the body weight of the animals (MANHAES DE CASTRO et al., 2001; DEIRÓ et al., 2008). SSRI like fluoxetine have an anorexic effect (Deiró et al., 2008; GALINDO et al., 2015). Because of this effect, fluoxetine has been used as a pharmacological adjuvant for the treatment of obesity, promoting weight loss in both humans and

animals (LAUZURICA et al., 2013). The PC induction technique also influenced the lower weight gain of the animals of this group, similar to other results found in works with the same model used for PC induction (Silva et al., 2006; Lacerda, DC et al., 2017).

One of the reasons attributed to the decrease in weight gain is the injury caused by sensorimotor restriction. The episode of perinatal anoxia alone does not have the potential to cause deleterious effects, whereas in studies where the perinatal anoxia and sensorimotor restriction groups were analyzed separately, the animals present in the groups with sensorimotor restriction had a decrease in body weight, especially after the period of lactation (STRATA et al., 2004; MARCUZZO et al., 2010). When the neonatal pharmacological treatment was associated with CP, there was potentiation of the anorectic effect, since the lower body weight resulting from PC induction (SILVA et al., 2016; LACERDA, D.C. et al., 2017), combined with the lower food intake of animals handled with fluoxetine (GALINDO et al., 2015) appeared to increase body weight damage by bringing the animals in that group to values even lower than the values of the two individual manipulations.

Neonatal pharmacological manipulation reduced the body length of the animals (DEIRO et al., 2004; LOPES DE SOUZA et al., 2004). According to DEIRÓ et al., 2004, neonatal treatment with citalopram, another SSRI, decreases somatic growth in rats. These changes were important to indicate the influence of 5-HT on the growth of non-neural body tissues through SSRIs (DEIRÓ et al., 2004). The lower body weight in CP animals was associated with lower somatic growth in this group. There was a decrease in the measurements in all axes measured in experimental animals similar to other studies that associated reduced animal growth with sensorimotor restriction (STRATA et al., 2004; MARCUZZO et al., 2008).

According to STRATA et al., 2004, the lower growth rate of the animals in the groups that were associated with the sensorimotor restriction and the alteration of the biomechanical properties of the muscle occurred due to the lower food intake caused by the difficulty of locomotion. The animals that in addition to the experimental cerebral palsy were submitted to the pharmacological manipulation again had a potentialization in the damage related to the development. These injuries are intensified by the greater weakness of the animals in that group, due to difficulties in

eating (STRATA et al., 2004), both CP injury and the anorexic effect of pharmacological manipulation (GALINDO et al., 2015; SILVA et al., 2016), resulting in lower rates of somatic growth and body weight.

Regarding the development of physical characteristics, there was no difference between groups regarding maturation. Contrary to our findings, Deiró et al., 2004 observed delayed eruption of the incisors and opening of the auditory canal after chronic administration of citalopram during the neonatal period. The chronic administration of fluoxetine during the same period, however, did not modify the physical characteristics in the present study. This difference can be explained by the fact that Deiró et al., 2004, in addition to having used another type of SSRI, citalopram, also began pharmacological manipulation previously in comparison to our treatment. Toso et al., 2005, observed delay in the appearance of eye opening in animals submitted to an experimental model of cerebral palsy. These authors, however, used another experimental model of cerebral palsy through the application of a lipopolysaccharide (LPS) still in gestation. The inflammation caused by LPS altered the cellular mechanisms of development of the opening of the eyes (TOSO et al., 2005). In the present study, perinatal anoxia and motor sensory restraint are injuries caused in the postnatal period and did not compromise the physical characteristics of the animals. Corroborating with our findings, MARCUZZO et al., 2010, did not observe changes in physical characteristics after perinatal anoxia and sensorimotor restriction. In our findings, there were no changes in the animals submitted to neonatal pharmacological manipulation even when this manipulation was associated with experimental cerebral palsy.

Other signs of altered nervous system development may be seen by delayed maturation of the reflexes. Postnatal development involves the maturation of various systems and the study of reflexes gives us information that can be correlated with the development of the nervous system of animals (FOX, 1965). The findings of our study revealed that the differences in ontogeny of the reflexes appeared only among the animals in the group that underwent cerebral palsy for the reflexes that mature from the 11 th day of postnatal life: straightening in free fall and negative geotaxia . In animals submitted to neonatal treatment as SSRI, there were no changes in the appearance of reflexes. The reflections that mature before this time did not show differences between the maturation dates. Our findings confirm the results of

Marcuzzo et al., 2010, which in a similar experimental model of CP also observed delay in the reflection of negative geotaxia. The negative geotaxia reflex requires the development of locomotion together with increased animal strength, and appears at the stage where the mouse is already seeking to feed itself (FOX, 1965). As the sensorial motor restriction causes several deleterious effects among them the decrease of the force, this damages the maturation of the reflex of negative geotaxia in the animals induced to the CP.

Interestingly, animals submitted to cerebral palsy associated with an SSRI had no retardation in the reflexes compared to the animals of the PC + S group. PC seems to have more influence on reflex delay than neonatal pharmacological manipulation. Although there are no studies to date that associate the use of SSRIs with the PC on the reflexes, what has been observed can be justified by the overlapping of the insult of the PC in relation to the pharmacological manipulation, especially with respect to the motor development. The reflexes that had delays in their maturation are composed of more complex tasks for the motor system that need movement association, coordination and force (FOX, 1965).

In the analysis of the locomotor activity, there was less distance traveled, average velocity, power, kinetic energy, and increase of the stopped time in the animals submitted to CP on the 17th day. Corroborating our findings Silva et al., 2016, also observed a decrease in the distance traveled, mean power, kinetic energy and increase in the standing time in the animals submitted to the same model of cerebral palsy from the same date. Marques et al., 2014, also observed that animals with CP had lower spontaneous locomotor activity. Animals submitted to sensorimotor restriction showed abnormal gait patterns with decreased gait size (MARCUIZZO et al., 2008). These changes had a crucial effect on the development of locomotor activity in animals submitted to CP, reducing total distance, and also increasing the time spent in the field (Silva et al., 2016). These same changes were observed on day 17, in the control animals that received only the pharmacological manipulation. Similarly, Lee; Lee, 2012, administered an SSRI, fluoxetine, from birth to the fourth postnatal day and observed the reduction of the distance traveled by the animals in the open field at 30 days of life (LEE, LEE, 2012). There was an aggravation of these damages when the neonatal pharmacological manipulation was associated with CP in the present study. These animals showed a decrease in

distance traveled, speed and increase standing time compared to animals with CP that did not receive pharmacological manipulation. This delay seen in locomotion may be related to the factors that lead us to believe that the animals of the CP + F group are more fragile, because they present less somatic development and lower body weight, influencing their locomotion.

In the analysis of coordination, another point of motor development monitoring, animals with CP had lower latency between falls, reinforcing the idea that the PC induction model causes motor coordination and development deficits (ROUSSET et al., 2013; MARQUES et al. Al., 2014). Neonatal pharmacological manipulation also decreased the latency of falls in animals. Although Fernández-Guasti et al., 2016, did not find alterations in the results of motor coordination, evaluated by Rotarod, and comparing young adult rats (3-5 months) of different sexes after acute application of (5 and 10mg / kg) of fluoxetine. Lee; Lee, 2012, also observed lower fall latency in animals receiving fluoxetine from birth to the fourth postnatal day.

In the microscopic analysis of the cells of the nervous tissue, precisely the cells of the S1 area of the somatosensory cortex, there was a decrease in the number of neurons and increase of the glia cells and the glia index / neurons in the animals with CP. Marcuzzo et al., 2010 also observed a decrease in the amount of neurons and increase of the glial cells in the S1 area of the V layer of somatosensory cortex in animals with CP. Other studies that found a decrease in the number and size of motor neurons of PC animals attribute this characteristic to the movement restriction caused by immobilization in the PC induction model that changes development causing inhibition of motoneuron growth (STIGGER; NASCIMENTO, DO et al). In animals that underwent neonatal pharmacological manipulation, there was also a decrease in neurons and an increase in glial cells. Pharmacological inhibition of fluoxetine increases the level of 5-HT in the brain (MALAGIÉ et al., 1995). The altered levels of 5-HT during the first postnatal days may alter the morphogenesis of growing neurons (LEE; LEE, 2012).

Animals receiving fluoxetine from birth to the fourth postnatal day showed dendritic remodeling, including dendritic branching, stretching and pruning of neurons at 7 and 8 days postnatal life (Liao et al., 2011). In another study, also corroborating our findings, animals receiving fluoxetine from birth to the sixth day postnatal life had

reduced dendritic extension and lower dendritic length, as well as a smaller dendritic field in somatosensory cortex IV neurons at 30- 35 days postnatal life. In the animals with PC that received the pharmacological manipulation neonatal also there was decrease of the amount of the neurons and increase of the cells of the glia, besides the increase of the glia / neuron index compared the animals with PC. The increased amount of glial cells in animals with paralysis that received pharmacological manipulation demonstrates a process of cerebral plasticity, since these cells have functions of neurotransmitter release and synapses functioning (GOMES et al., 2013).

FINAL CONSIDERATIONS

We conclude that cerebral palsy and neonatal pharmacological inhibition decrease locomotor activity, impair motor coordination, increase glial cells, and decrease sensory somatostatic neurons in animals. Exposure to drugs during lactation in rats can be considered a model for the study of drug abuse in humans (XU et al., 2004; THOMPSON et al., 2010). The present study confirms that the development of the neuromusculoskeletal system is sensitive to cerebral palsy and neonatal pharmacological inhibition, in order to delay this development. In addition, it demonstrates that exposure to fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, aggravates neuromotor damage in animals undergoing cerebral palsy.

CONFLICT OF INTERESTS

I declare that there is no conflict of interest of the proposal presented.

REFERENCES

- ADLARD, B.; DOBBING, J. Elevated acetylcholinesterase activity in adult rat brain after undernutrition in early life. **Brain Research**, v. 9, n. 30, p. 198–9, 1971.
- ARAGÃO, R. DA S.; RODRIGUES, M. A. B.; BARROS, K. M. F. T. DE; et al. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents-A reproducibility study. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 216–221, 2011.
- ARAÚJO, L. Profile of cerebral palsy in a rehabilitation hospital in Brazil. , v. 49, n. 4, p. 242–249, 2012.
- AZMITIA, E. C. Serotonin and Brain: Evolution, Neuroplasticity, and Homeostasis. **International Review of Neurobiology**, v. 77, n. July 2015, p. 31–56, 2006.
- BAX M, GOLDSTEIN M, R. P. Proposed definition and classification of cerebral palsy. **Dev Med Child Neurol.**, v. 47, n. 8, p. 571–6, 2005.
- BENNETT-CLARKE, C. A; HANKIN, M. H.; LESLIE, M. J.; CHIAIA, N. L.; RHOADES, R. W. Patterning of the neocortical projections from the raphe nuclei in perinatal rats: investigation of potential organizational mechanisms. **The Journal of comparative neurology**, v. 348, n. 2, p. 277–90, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7814692>>. .
- BENTO-SANTOS, A.; SANTOS, J.; SILVA, A.; et al. Critérios para escolha da amostra em experimentos com ratos Wistar. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 1, n. 1, p. 121–129, 2012.
- BERG, B. **Child Neurology: a clinical manual**. 2nd ed. ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1994.
- BERG, W. D. J. VAN DE; BLOKLAND, A.; CUELLO, A. C.; SCHMITZ, C.; VREULS, W. Perinatal asphyxia results in changes in presynaptic bouton number in striatum and cerebral cortex — a stereological and behavioral analysis. , v. 20, p. 71–82, 2000.
- BLUE, M.; ERZURUMLU, R.; JHAVERI, S. A comparison of pattern formation by thalamocortical and serotonergic afferents in the rat barrel field cortex. **Cerebral Cortex**, v. 1, n. 5, p. 380–9, 1991.
- BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 6, p. 881–897, 2010. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2010.03.005>>. .

BORUE, X.; CHEN, J.; CONDRON, B. G. Developmental effects of SSRIs: lessons learned from animal studies. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 25, n. 6, p. 341–347, 2007.

BUDHDEO, S.; RAJAPAKSA, S. Functional recovery in cerebral palsy may be potentiated by administration of selective serotonin reuptake inhibitors. **Medical Hypotheses**, v. 77, n. 3, p. 386–388, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2011.05.026>>. .

CHOLLET, F.; TARDY, J.; ALBUCHER, J. F.; et al. Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): A randomised placebo-controlled trial. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 2, p. 123–130, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70314-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70314-8)>. .

COLVER, A.; FAIRHURST, C.; PHAROAH, P. O. D. Cerebral palsy. **The Lancet**, v. 383, n. 9924, p. 1240–1249, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61835-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61835-8)>. .

COQ, J. O.; STRATA, F.; RUSSIER, M.; et al. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: Implications for cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p. 95–108, 2008. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.006>>. .

DEIRÓ, T. C. B. D. J.; CARVALHO, J.; NASCIMENTO, E. DO; et al. Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 66, n. 3 B, p. 736–740, 2008.

EKLIND, S.; MALLARD, C.; ARVIDSSON, P.; HAGBERG, H. Lipopolysaccharide induces both a primary and a secondary phase of sensitization in the developing rat brain. **Pediatric Research**, v. 58, n. 1, p. 112–116, 2005.

FERRAZ, C. R. A.; ARAÚJO, M. V. DE; CARREIRO, L. R. R. Inclusão de crianças com Síndrome de Down e paralisia cerebral no ensino fundamental I: comparação dos relatos de mães e professores. **Revista Brasileira de Educação Especial**, v. 16, n. 3, p. 397–414, 2010. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79952306351&partnerID=tZOtx3y1>>. .

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Animal**

Behaviour, v. 13, n. 2–3, p. 234–IN5, 1965. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003347265900412>>. .

GALINDO, L. C. M.; BARROS, M. DA L. D.; PINHEIRO, I. L.; et al. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. **International Journal of**

Developmental Neuroscience, v. 46, p. 76–81, 2015. International Society for Developmental Neuroscience. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.07.004>>. .

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 12, p. 1002–1012, 2003.

GHOSH, M.; PEARSE, D. D. The role of the serotonergic system in locomotor recovery after spinal cord injury. **Frontiers in neural circuits**, v. 8, n. February, p. 151, 2014. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4321350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

GLAZOVA, N. Y.; MERCHIEVA, S. A.; VOLODINA, M. A.; et al. Effects of neonatal fluvoxamine administration on the physical development and activity of the serotonergic system in white rats. **Acta Naturae**, v. 6, n. 22, p. 98–105, 2014.

HALES, C.; BARKER, D. The thrifty phenotype hypothesis. **British medical bulletin**, v. 60, n. 5, p. 5–20, 2001.

HIMMELMANN, K.; AHLIN, K.; JACOBSSON, B.; CANS, C.; THORSEN, P. Risk factors for cerebral palsy in children born at term. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 90, n. 10, p. 1070–1081, 2011.

ITO, J. ICHI; ARAKI, A.; TANAKA, H.; et al. Muscle histopathology in spastic cerebral palsy. **Brain and Development**, v. 18, n. 4, p. 299–303, 1996.

JACOBS, B. L.; AZMITIA, E. C. Structure and function of the brain serotonin system. **Physiological reviews**, v. 72, n. 1, p. 165–229, 1992.

JAMON, M.; CLARAC, F. Early walking in the neonatal rat: a kinematic study.

Behavioral Neuroscience, v. 112, n. 5, p. 1218–1228, 1998.

JOHNSTON, M. V.; FERRIERO, D. M.; VANNUCCI, S. J.; HAGBERG, H. Models of Cerebral Palsy. **Journal of Child Neurology**, v. 20, n. 12, p. 984–987, 2005.

Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/08830738050200121001>>.

- JONES, M. W.; MORGAN, E.; SHELTON, J. E.; THOROGOOD, C. Cerebral Palsy: Introduction and Diagnosis (Part I). **Journal of Pediatric Health Care**, v. 21, n. 3, p. 146–152, 2007.
- KIASATDOLATABADI, A.; LOTFIBAKHSHAIESH, N.; YAZDANKHAH, M.; et al. The Role of Stem Cells in the Treatment of Cerebral Palsy: a Review. **Molecular Neurobiology**, p. 1–10, 2016. Molecular Neurobiology. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s12035-016-0030-0>>. .
- KOLB, B.; GIBB, R. Brain plasticity and behaviour in the developing brain. **J Can Acad Child Adolesc Psychiatry**, v. 20, n. 265–276, 2011.
- KOLB, B.; GIBB, R.; ROBINSON, T. E. Brain Plasticity and Behavior. **Current Directions in Psychological Science**, v. 12, n. 1, p. 2–5, 2003.
- KOMAN, L. A.; SMITH, B. P.; SHILT, J. S. Cerebral palsy. **Lancet**, v. 363, n. 9421, p. 1619–1631, 2004.
- KONOPASKE, G. T.; DORPH-PETERSEN, K.-A.; PIERRI, J. N.; et al. Effect of chronic exposure to antipsychotic medication on cell numbers in the parietal cortex of macaque monkeys. **Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 6, p. 1216–1223, 2007.
- KRIGGER, K. W. Cerebral Palsy : An Overview. **American Family Physician**, v. 73, n. 1, p. 91–100, 2006.
- KUPERMAN, A. S. Effects of acrylamide on the central nervous system of the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2013. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/123/3/180.long%5Cnpapers://c3e98fae-7b9a-4503-a691-ac4d4e660aec/Paper/p4295>>. .
- LACERDA, D. C.; FERRAZ-PEREIRA, K. N.; TERÁCIO, A.; RODRIGUES, BÁRBARA JUACY GUZMAN QUEVEDO, OMAR A , MANHÃES-DE-CASTRO, R.; TOSCANO, A. E. OROFACIAL FUNCTIONS IN EXPERIMENTAL MODELS OF CEREBRAL PALSY: A SYSTEMATIC REVIEW. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 4, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28160523>>. .
- LACERDA, D. C.; FERRAZ-PEREIRA, K. N.; VISCO, D. B.; et al. Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse

- effects on chewing in young rats. **Physiology and Behavior**, v. 173, p. 69–78, 2017. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.043>>. .
- LAUDER, J.; KREBES, H. Serotonin as a differentiation signal in early neurogenesis. **Developmental Neuroscience**, v. 1, n. 1, p. 15–30, 1978.
- LEE, L. J. Neonatal Fluoxetine Exposure Affects the Neuronal Structure in the Somatosensory Cortex and Somatosensory-Related Behaviors in Adolescent Rats. **Neurotoxicity Research**, v. 15, n. 3, p. 212–223, 2009.
- LEE, L. J.; LEE, L. J. H. Neonatal fluoxetine exposure alters motor performances of adolescent rats. **Developmental Neurobiology**, v. 72, n. 8, p. 1122–1132, 2012.
- LI, H. J.; JOHNSTON, B.; AIELLO, D.; et al. Distinct cellular origins for serotonin-expressing and enterochromaffin-like cells in the gastric corpus. **Gastroenterology**, v. 146, n. 3, p. 754–764.e3, 2014. Elsevier, Inc. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.048>>. .
- LIAO, C. C.; LEE, L. J. Neonatal fluoxetine exposure affects the action potential properties and dendritic development in cortical subplate neurons of rats. **Toxicology Letters**, v. 207, n. 3, p. 314–321, 2011. Elsevier Ireland Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.09.028>>. .
- LIDOV, H. G. W.; MOLLIVER, M. E. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: Ascending pathways and terminal fields. **Brain Research Bulletin**, v. 8, n. 4, p. 389–430, 1982.
- LIPTON, S. A.; KATER, S. B. Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plastid and survival. **Trends Neurosci.**, v. 12, n. 7, p. 265–270, 1989. Disponível em: <file:///d:/okujeni/literature/papers/Lipton89_.pdf>. .
- LISOVSKA, N.; DARIBAYEV, Z.; LISOVSKYY, Y.; et al. Pathogenesis of cerebral palsy through the prism of immune regulation of nervous tissue homeostasis: literature review. **Child's Nervous System**, v. 32, n. 11, p. 2111–2117, 2016. Child's Nervous System. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00381-016-3245-5>>. .
- LOPES DE SOUZA, S.; NOGUEIRA, M. I.; JESUS DEIRÓ, T. C. B. DE; et al. Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. **Physiology and Behavior**, v. 82, n. 2–3, p. 375–379, 2004.
- MACHADO, V.; PIMENTEL, S.; PINTO, F.; NONA, J. Perinatal ischemic stroke: a five-year retrospective study in a level-III maternity. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 1, p. 65–71, 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25993071>>. .

MANABAT, C.; HAN, B. H.; WENDLAND, M.; et al. Reperfusion differentially induces caspase-3 activation in ischemic core and penumbra after stroke in immature brain.

Stroke, v. 34, n. 1, p. 207–213, 2003.

MARBINI, A.; FERRARI, A.; CIONI, G.; et al. Immunohistochemical study of muscle biopsy in children with cerebral palsy. **Brain & development**, v. 24, n. 2, p. 63–66, 2002.

MARCUZZO, S.; DUTRA, M. F.; STIGGER, F.; et al. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. **Brain and Development**, v. 32, n. 4, p. 323–331, 2010.

MARCUZZO, S.; FERREIRA DUTRA, M.; STIGGER, F.; et al. Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: Walking pattern and soleus quantitative histology. **Brain Research**, v. 1222, p. 129–140, 2008.

MARQUES, M. R.; STIGGER, F.; SEGABINAZI, E.; et al. Beneficial effects of early environmental enrichment on motor development and spinal cord plasticity in a rat model of cerebral palsy. **Behavioural Brain Research**, v. 263, p. 149–157, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.007>>. .

MATEOS, S. S.; SÁNCHEZ, C. L.; PAREDES, S. D.; BARRIGA, C.; RODRÍGUEZ, A. B. Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 104, n. 1, p. 52–59, 2009.

MAZER, C.; MUNEEYIRCI, J.; TAHENY, K.; et al. Serotonin depletion during synaptogenesis leads to decreased synaptic density and learning deficits in the adult rat: A possible model of neurodevelopmental disorders with cognitive deficits. **Brain Research**, v. 760, n. 1–2, p. 68–73, 1997.

MCINTYRE, S.; TAITZ, D.; KEOGH, J.; et al. A systematic review of risk factors for cerebral palsy in children born at term in developed countries. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 55, n. 6, p. 499–508, 2013.

MEIRELES, A. L. F.; MARQUES, M. R.; SEGABINAZI, E.; et al. Association of environmental enrichment and locomotor stimulation in a rodent model of cerebral palsy: Insights of biological mechanisms. **Brain Research Bulletin**, v. 128, p. 58–67, 2017. Elsevier Inc. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.12.001>>. .

MORETTI, M.; COLLA, A.; OLIVEIRA BALEN, G. DE; et al. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. **Journal of Psychiatric Research**, v. 46, n. 3, p. 331–340, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.11.009>>. .

MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91–128, 1993.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, p. 471–83, 2002.

NARBOUX-NÊME, N.; PAVONE, L. M.; AVALLONE, L.; ZHUANG, X.; GASPAR, P. Serotonin transporter transgenic (SERT^{cre}) mouse line reveals developmental targets of serotonin specific reuptake inhibitors (SSRIs). **Neuropharmacology**, v. 55, n. 6, p. 994–1005, 2008.

NOVACHEK, T. F.; GAGE, J. R. Orthopedic management of spasticity in cerebral palsy. **Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery**, v. 23, n. 9, p. 1015–1031, 2007.

NOVÍO, S.; NÚÑEZ, M. J.; AMIGO, G.; FREIRE-GARABAL, M. Effects of Fluoxetine on the Oxidative Status of Peripheral Blood Leucocytes of Restraint-Stressed Mice. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 109, n. 5, p. 365–371, 2011.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain on Stereotaxic Coordinates**. 6th ed. ed. Academic Press, 2006.

PAZAITI, A.; SOUBASI, V.; SPANDOU, E.; et al. Evaluation of Long-Lasting Sensorimotor Consequences following Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Rats: The Neuroprotective Role of MgSO₄. **Neonatology**, v. 95, n. 1, p. 33–40, 2009.

PERSICO, A. M.; MENGUAL, E.; MOESSNER, R.; et al. Barrel pattern formation requires serotonin uptake by thalamocortical afferents, and not vesicular monoamine release. **The Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 17, p. 6862–6873, 2001.

PFLIEGER, J.-F.; CLARAC, F.; VINAY, L. Postural modifications and neuronal excitability changes induced by a short-term serotonin depletion during neonatal

development in the rat. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 12, p. 5108–17, 2002. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077206>>. .

RAYMOND, J. R.; MUKHIN, Y. V.; GELASCO, A.; et al. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. **Pharmacology & therapeutics**, v. 92, n. 2–3, p. 179–212, 2001.

REBEL, M. F.; RODRIGUES, R. F.; CORRÊA, C. L. Prognóstico Motor E Perspectivas Atuais Na Paralisia Cerebral Motor Prognosis and Current Perspectives in. , v. 20, n. 2, p. 342–350, 2010.

RENOLLEAU, S.; AGGOUN-ZOUAOUI, D.; BEN-ARI, Y.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 29, n. 7, p. 1454–60; discussion 1461, 1998.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660403>>. .

RIBAS, V. R.; ANICETO, H. K. R.; MARTINS, H. A. D. L.; et al. Neonatal administration of fluoxetine did not alter the anxiety indicators, but decreased the locomotor activity in adult rats in the elevated plus maze Administração neonatal de fluoxetina não alterou os indicadores de ansiedade, mas diminuiu a atividade l.

Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v. 66, n. May, p. 844–847, 2008. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=0004-282X20080006&lng=pt&nrm=iso>. .

RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 3, p. 511–533, 2000.

RICE, J.; VANNUCCI, R.; BRIERLEY, J. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. **Annals of Neurology**, v. 9, n. 2, p. 131–141, 1981.

ROSENBAUM, P.; MORRIS, C.; BAXTER, P.; et al. The Definition and Classification of Cerebral Palsy Contents Foreword Historical Perspective Definition and Classification Document. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 49, n. 109, p. 1–44, 2007.

ROUSSET, C. I.; KASSEM, J.; AUBERT, A.; et al. Maternal exposure to lipopolysaccharide leads to transient motor dysfunction in neonatal rats.

Developmental Neuroscience, v. 35, n. 2–3, p. 172–181, 2013.

- SCHMIDT, B. J.; JORDAN, L. M. The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 53, n. 5, p. 689–710, 2000.
- SILVA, A. I.; GALINDO, L. C. M.; NASCIMENTO, L.; et al. Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 92, n. 4, p. 330–337, 2014.
- SILVA, C. M. DA; GONÇALVES, L.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; NOGUEIRA, M. I. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. **Neuroscience Letters**, v. 483, n. 3, p. 179–183, 2010.
- SILVA, H. J. DA; OLIVEIRA CAVALCANTI MARINHO, S. M.; TOSCANO MENESES DA SILVA, A. E.; et al. Protocol of Mensuration to Avaliation of Indicators of Somatic Development of Wistar Rats. **International Journal of Morphology**, v. 23, n. 3, p. 227–230, 2005.
- SILVA, K. O. G. DA; PEREIRA, S. DA C.; PORTOVEDO, M.; et al. Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 52, p. 38–45, 2016.
- SŁAWIŃSKA, U.; MIAZGA, K.; JORDAN, L. M. The role of serotonin in the control of locomotor movements and strategies for restoring locomotion after spinal cord injury. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 74, n. 2, p. 172–187, 2014.
- SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research**, v. 28, n. 1, p. 85–95, 1971.
- SPINKS, D.; SPINKS, G. Serotonin reuptake inhibition: an update on current research strategies. **Current Medical Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 799–810, 2002.
- STEARNS, S.; JONG, G. DE; NEWMAN, B. The effects of phenotypic plasticity on genetic correlations. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 4, p. 122–126, 1991.
- STIGGER, F.; FELIZZOLA, A. L. D. S.; KRONBAUER, G. A.; et al. Effects of fetal exposure to lipopolysaccharide, perinatal anoxia and sensorimotor restriction on motor skills and musculoskeletal tissue: Implications for an animal model of cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 228, n. 2, p. 183–191, 2011. Elsevier Inc.
- Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.001>>. .

STIGGER, F.; NASCIMENTO, P. S. DO; DUTRA, M. F.; et al. Treadmill training induces plasticity in spinal motoneurons and sciatic nerve after sensorimotor restriction during early postnatal period: New insights into the clinical approach for children with cerebral palsy. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 8, p. 833–838, 2011. International Society for Developmental Neuroscience. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.09.002>>. .

STRATA, F.; COQ, J. O.; BYL, N.; MERZENICH, M. M. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: Implications for a rodent model of cerebral palsy. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 141–156, 2004.

SWERDLOW, N.; GEYER, M. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v. 24, n. 2, p. 285–301, 1998.

UYLINGS, H.; ZILLES, K.; RAJKOWSKA, G. Optimal Staining Methods for Delineation of Cortical Areas and Neuron Counts in Human Brains. **NeuroImage**, v. 9, n. 4, p. 439–445, 1999.

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

ZEHR, E. P.; STEIN, R. B. What functions do reflexes serve during human locomotion? **Progress in Neurobiology**, v. 58, n. 2, p. 185–205, 1999.

APÊNDICE B– OROFACIAL FUNCTIONS IN EXPERIMENTAL MODELS OF CEREBRAL PALSY: A SYSTEMATIC REVIEW

Running head/Short title: Cerebral Palsy and Orofacial functions

Article category: Review

Diego Cabral Lacerda¹, Kelli Nogueira Ferraz-Pereira², André Terácio³, Bárbara Juacy Rodrigues Costa de Santana⁴, Omar Guzman Quevedo⁵, Raul Manhães-de-Castro⁶, Ana Elisa Toscano⁷

¹Post Graduate Program in Nutrition, Federal University of Pernambuco UFPE, Recife, PE, Brazil.

²Department of Physical Education and Sports Science, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

³Post Graduate Program in Physical Therapy, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁴Post Graduate Program in Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Federal University of Pernambuco UFPE, Recife, PE, Brazil.

⁵Facultad de Químico-Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, C. P. 58240 Morelia, Michoacán, Mexico.

⁶Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

⁷Department of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil.

Address of corresponding author:

Dr K. N. Ferraz-Pereira

Department of Physical Education and Sports Science

Centro Acadêmico de Vitória – UFPE

Rua Alto do Reservatório, S/N – Bela Vista, CEP: 55608-680, Vitória de Santo Antão – PE, Brasil.

Telephone: (081) 3114-4108 kelliferraz@hotmail.com

ABSTRACT

Background: Children with Cerebral palsy usually have also comorbidities called orofacial dysfunctions. Studies in animals have contributed to elaborate potential therapies aimed at minimizing the chronic inability of the syndrome. **Objective:** To produce a systematic review about the possible effects on the orofacial functions induced by experimental models of cerebral palsy. **Methods:** Two independent reviewers conducted a systematic review in electronic databases Medline, Scopus, CINAHL, Web of Science and Lilacs, using the Mesh and Decs descriptors in animal models. The motor and sensory parameters of sucking, chewing and swallowing were considered as a primary outcome and reactivity odor, control salivation, postural control and mobility of the head during feeding, and the animal's ability to acquire food as secondary outcomes. The assessment of the risk of bias of the studies was carried out by method described by Hooijmans et al. (2010). **Results:** Ten studies were selected. Most studies used rabbits as experimental model of CP. Cerebral palsy was induced by hypoxia-ischemia, inflammation or intraventricular hemorrhage. In all experimental models of CP analyzed, the orofacial functions were modified. There were more modifications in hypoxia-ischemia models compared to the other experimental models of CP. However, the model of inflammation was more effective to reproduce higher damage in coordinating the suction and swallowing. **Conclusion:** All CP experimental models analyzed modify the oral functions and periods in different species of animals. However, studies should be conducted in order to clarify the mechanisms underlying the orofacial damage and optimize treatment strategies offered for children with CP.

Key-words: Animal models. Cerebral Palsy. Feeding Behavior. Sucking. Chewing. Swallowing.

BACKGROUND

Cerebral palsy (CP) is described as a neurological syndrome characterized by changes in movement, posture and muscle tone, resulting of non-progressive lesion that occurs in fetal central nervous system or child development¹. This syndrome causes limitations in activities of daily living of the child and functional dependency². The insult may occur still during the pregnancy, during birth or in early life³. The prevalence of the CP is 2 to 3.5 per 1000 live births^{4,5}. The most cases of CP occur by problems during the prenatal period (70 to 80%), followed by central nervous system infections during the postnatal period and complications in labor, as asphyxia neonatal^{6,7}.

Children with CP usually have also comorbidities including problems with drooling, sucking, chewing and swallowing, called orofacial dysfunctions⁸⁻¹⁰. These problems result in feeding difficulties and poor nutritional state^{11,12}. It is estimated that 85% of children with CP have feeding difficulties¹³, 65% have deficits in the masticatory movements and 40% have dysfunction in control of saliva¹⁴.

The feeding difficulties observed in children with CP increase the risk of mortality and are associated with poor prognosis of the syndrome¹⁵. The most common causes of death in children with cerebral palsy that are secondary to respiratory disorders and orofacial dysfunctions are important to highlight¹⁶. In underdeveloped countries most of children with CP have feeding difficulties leading to moderate or severe malnutrition^{17,18}. There are reports that malnutrition is the leading cause of death in children with CP in some underdeveloped countries as in the Indian subcontinent ¹⁹.

The impairments in orofacial functions damage the child's ability to safely consume the calories and nutrients needed for growth²⁰. In addition, abnormalities in anatomical structures involved with the oral preparation and with the development of the reflex of swallowing can result in severe feeding dysfunction and inadequate food intake^{20,21}. Furthermore, these abnormalities limit food intake due to the lack of control of salivation, coughing episodes, incoordination of mandibular muscles, poor control of tongue, delayed swallowing, resulting in an extended mealtime and frustration of the child and parents^{22,23}.

The CP is considered the most common cause of disability in childhood²⁴ and studies in animals have provided important advances and great knowledge of the pathogenesis of this syndrome²⁵. Such studies have contributed to elaborate potential therapies aimed at minimizing the chronic inability of the syndrome²⁶. Experimental models replicate one or more of the main features of the CP in animals. However, there is significant heterogeneity in these models. The variability in the experimental models involves different aspects of the syndrome, such as time, the mechanism, the extent of injury, the use of different species and evaluated parameters.

Most of the studies that use experimental models of CP investigate the mechanisms underlying neurological findings and changes in locomotor activity. However, studies in the literature about the mechanisms related to feeding behavior and orofacial functions of these animals are scarce. Therefore, the impact of experimental models of CP in orofacial functions and the evaluation of provoked impairments and mechanisms associated with these events are important to assess. Given the above, the objective of this study is to produce a systematic review that shows the possible effects induced by experimental models of CP on the orofacial functions and investigate the mechanisms associated with these effects. Thus, the following focused question was addressed: “Animals submitted to experimental model of CP develop orofacial alterations compared to animals whose not exposed to any model?”

METHODS

This systematic review complies with Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA)²⁷. In addition, the protocol of this systematic review was published in Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies (CAMARADES) (Registration number: SC005336).

Search Strategy

The literature search was conducted in April 2015 in the electronic databases Medline/ Pubmed (National Library of Medicine/ Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), SCOPUS, CINAHL, Lilacs (Latin American and Caribbean Health Sciences) and Web of Science. The research focused on experimental studies using experimental models of CP in animals that evaluate the parameters of orofacial functions. Combination of MeSH descriptors or their DECS descriptors "Animals", "Models", "Animal Models", "Rats", "Rabbits", "Sheep", "Cats", "Primates", "Piglets", "Cerebral Palsy", "mouth", "Behavior", "Feeding Behavior", "Smell", "Mastication", "Sucking Behavior", "deglutition", "Olfaction disorders", "Salivation" and "Taste" were used. There was no restriction of the year or the publication of articles language. In addition, only experimental studies using animals were selected in this review.

The research was conducted in electronic databases by two independent reviewers (Lacerda DC and Terácio A) based on a pre-defined protocol. A third reviewer (Ferraz-Pereira KN) was consulted when needed as a mediator for the definition of inclusion or exclusion of items that there were no agreement between reviewers. Finally, the extraction of the data was performed according to the assessment of the eligibility criteria defined in the study.

Inclusion Criteria

To select the articles presented in this systematic review, the following inclusion criteria were established: a) Experimental models that used animals b) Articles with CP induction in animals during gestation or the first days of life c) Experimental articles that presented control group in their study design, and d) Articles that evaluated parameters of orofacial functions.

Exclusion Criteria

The articles were excluded when not described in detail and clearly the CP induction method, which would prevent replication of the model.

Assessment of articles

The methodological assessment of the studies and the risk of bias were carried out by specific issues to interfere in the internal validity of experimental studies, according to the points highlighted by Hooijmans et. al. (2010)²⁸: accommodation, lighting, temperature, water, diet and code of ethics. In the analysis of sample features, induction protocol of CP and evaluation of outcomes were considered animal species, CP model used, induction period and age of the evaluation of orofacial function parameters. Primary outcomes were motor and sensory parameters of the orofacial functions of sucking, chewing and swallowing. Secondary outcomes were odor sensitivity, postural control and mobility of the head during feeding, ability of the animal to acquire food and control salivation. The level of agreement between reviewers evaluating studies for data extraction and assessments study quality (risk of bias) was assessed by Kappa Statistics using Statistical Package for the Social Sciences – SPSS version 20 for Windows.

RESULTS

Initial research in databases made by two reviewers showed 1174 articles in Medline/ Pubmed, 452 articles in Scopus, 341 articles in CINAHL, 7 articles in Lilacs and 596 articles in Web of Science. After analyzing the titles and abstracts of all 2570 articles found, 2530 articles were excluded because they did not include outcomes set out in the inclusion criteria and/ or met the exclusion criteria. After thorough evaluation of the 40 included, 15 were duplicates and 15 did not meet the criteria for inclusion and/ or met the exclusion criteria. Then research finished with 10 articles, as shown in Figure 1.

Table 1 shows the evaluation of the articles according to the points highlighted by Hooijmans et. al. (2010). After evaluation of the quality criteria, we observed that all studies have methodological deficits. Of the ten articles included, only five studies met 60%^{29,31,32,34,36} of the criteria analysed. The level of agreement among reviewers for data extraction and bias risk analysis was high (Kappa: 0,783).

The characteristics of the samples and parameters evaluated in this review were summarized according to the model of CP in Table 2, 3 and 4. Three studies used inflammation as CP model (Table 2), two studies, intraventricular hemorrhage

(Table 3), and five, hypoxia-ischemia (Table 4). Of these articles, plus the variability in cerebral palsy induction model used, the heterogeneity of the included studies was also verified in the species of the animals, the CP induction period and in the evaluated parameters. Given the variety, the results were presented according to the findings of each induction model.

Of the 03 (three) articles used as CP method of inducing inflammation, 02 (two) underwent Lipopolysaccharide (LPS) administration in rabbit during pregnancy (8th day of pregnancy). Whereas one (01) author induced CP through the Ibotenic Acid (IBA) administration in rat (Wistar), in the postnatal period (5th or 7th day of postnatal life) (Table 2). As for verified outcomes, LPS administration promoted the lack of coordination of sucking and swallowing and reduced head movements during feeding rabbits on 1th day of postnatal life. While the administration of the IBA, assessed from 28th day of postnatal life led to damage the scope and acquisition of food (Table 2).

Regarding the studies that made use of intraventricular hemorrhage CP induction, one (01) article held glycerol administration in rabbit in the neonatal period (two hours of life). While one (01) the study made use of autologous blood infusion in rat neonatal period (24 to 36 hours on 1th day of postnatal life) (Table 3). The administration of glycerol did not cause damage on 14th day of postnatal life. In contrast, autologous blood infusion resulted in damage to the range and acquisition of food in the 70th day of postnatal life in rats (Table 3).

And finally, the five (05) articles used as CP induction model of hypoxia-ischemia, were all prepared in rabbits and ratings parameters of oral functions were performed on 1th day of postnatal life. However, in this model, variability was observed for the period of induction of hypoxia-ischemia, although all have occurred during pregnancy. Thus, one (01) article held induction during the intermediate pregnancy (21th, 22th and 25th days of pregnancy) and final (28th and 29th days of pregnancy); 01 (one), during 21th and 22th or 29th days of pregnancy; 01 (one), during 21th and 22th days of pregnancy; and 02 (two), during pregnancy on 22th day of gestation (Table 4). As for the observed outcomes, hypoxia-ischemia promoted incoordination of sucking and swallowing, impaired olfactory aversive response and reduction of head movements during feeding on 1th day of postnatal life (Table 4).

DISCUSSION

Systematic reviews of experimental studies have provided important information in understanding the underlying mechanisms involved in the disease. These data can assist the scientific community in making decisions based on evidence in health care. In this context, this systematic review aimed to bring together the studies that assessed the impact on orofacial functions caused from the CP induction in animals. The synthesis and analysis of the collected data, in particular those related to the control of orofacial functions sucking, chewing and swallowing, would make it possible to clarify the mechanisms associated with these events. However, the transition of the findings for clinical practice should be carried out carefully.

The articles present heterogeneities related to the CP model, the animal species assessed, the CP induction period, and age assessment, making unfeasible the application of meta-analysis. The CP induction period was performed during pregnancy or during parturition or in the first days of postnatal life. The models induced during parturition and in the first days of life, the damage was provoked directly in the pups. However, the experimental models of CP that were induced during pregnancy, caused a maternal insult and consequent cerebral damages in the pups. Models based on inflammation, the intrauterine administration of LPS on mothers promotes substantial activation of microglia in the pups' brain which is typical of CP^{29,33}. The models based on hypoxia-ischemia, pregnant females were submitted to uterine ischemia, in order to attempt to model an insult of placental insufficiency to premature infants^{31,32,35,37,38}. This model causes a global hypoxia in the fetuses, accompanied by an immediate decrease in the cerebral blood flow of the pups, resulting in neurological damage³².

Among the experimental models, it is observed that those based on maternal hypoxia-ischemia appear patterned, as in all studies there was variability only for the period of induction of hypoxia-ischemia. However, despite this, all articles induce hypoxia-ischemia during pregnancy, it moves only with respect to pregnancy (initial, intermediate or final). Moreover, models of hypoxia-ischemia are effective in the reproduction of several orofacial parameters, despite a high mortality rate (41, 42 and 50%)^{31,32}.

Studies have shown that experimental models of CP were able to reproduce the characteristics and damages of this disturb. The experimental models of CP induced in different studies are similar to spastic CP^{32,35}. Spastic CP may present as spastic diplegia (involvement of the legs with a slight effect on the arms), hemiplegia (involvement of the leg and ipsilateral arm) and quadriplegia (involving the four limbs)⁵. In addition, motor alterations observed in individuals with spastic CP may affect orofacial functions such as speech and swallowing⁴.

Among the orofacial outcomes reported in the studies we have incoordination of sucking and swallowing; reduction of head movements during feeding; damage to the range and acquiring food; and impaired olfactory aversive response. All the above changes, except for the damage to the reach and acquisition of food, were observed in models of hypoxia-ischemia. The induction of inflammation models promoted higher damage intensity in incoordination of sucking and swallowing. While the intraventricular hemorrhage caused damage in the reach and acquisition of food.

The models of hypoxia-ischemia and maternal inflammation promoting incoordination sucking and swallowing. This parameter was evaluated by the protocol of Derrick et al³². Briefly, the animals were individually filmed on a flat surface during feeding. Suction and swallowing were assessed by introduction of a formula into the pup's mouth with a plastic pipette. An incoordination of suckling and swallowing was observed in CP animals, evidenced from milk nasal regurgitation, inability to retain milk in the oral cavity and loss of all contents by drip^{29,31,32,33,35}. In humans, it is observed that this damage in coordinating suction, breathing and swallowing bolus²³ leads to recurrent aspiration to the interior of the airways and consequently chest infections and lung problems^{39,40}. The difficulty of retaining the food cake or fluid within the oral cavity contributes to the poor nutritional status and dehydration^{22,23,41}.

The mobility of the head was also evaluated by the protocol of Derrick et al³². This consisted of offering milk in a plastic pipette on the side of the animals' mouths. The delay or absence of head mobility from the milk supply of stimulus in the side of his mouth was observed in animals that suffered hypoxia-ischemia or maternal inflammation. In children it is often the deficit in the movements of the head, neck, trunk and upper limbs, while feeding⁴² and reducing the sucking reflex⁴³. For effective oral functioning during feeding is necessary to head stability for better control of the

jaw⁴⁴. The head control is influenced by the trunk line⁴⁴. Therefore, these deficits in body movements result in reduced dietary intake, prolonged feeding time and poor nutritional status⁴⁵.

The ability to achieve and acquire the food was evaluated by the capacity of the animals to use the forepaws to feed^{30,36}. It was observed if the animal reached the food, grasped it and fed without dropped pellet. Studies revealed that animals with cerebral palsy subsequent postnatal inflammation or intraventricular hemorrhage had difficulties in using the forepaws to reach and manipulate the food accurately dropping frequently^{30,36}. Children with CP often are unable to maintain and manipulate food on the tongue, mouth dropping²². Also severe cerebral asymmetries associated with poor sitting posture during feeding are observed in children with cerebral palsy⁴³. These abnormalities impair the coordinated use of hands to conduct the food to the mouth⁴⁶, leading to an inadequate intake of nutrients⁴⁶. In summary, the precariousness of orofacial functions correlates with increased limitations in gross motor function and increased limitations in manual abilities⁴⁷. However, we found no studies in the literature that addressed the postural control during feeding and control salivation and food consumption.

Furthermore, odor sensitivity was tested by aversive response to a cotton swab soaked with odorant (peppermint or pure ethanol³¹ and amyl acetate^{35,37,38}). The absence or delay of aversive response elicited by olfactory stimulation was observed in models of hypoxia-ischemia during the gestation period. Mathew Derrick and colleagues³² observed extensive degeneration of the piriform cortex induced by hypoxia-ischemia during pregnancy. The piriform cortex is considered the main area that integrates and transmits the information to the olfactory bulb olfactory^{37,38}. It is suggested that the injury in this region may explain the absence or delay in aversive olfactory response in animals subjected to oxygen deprivation. However more experimental studies are needed to investigate other mechanisms that explain the basis of these behavioral and motor findings.

These motors damage may be associated with changes in the nervous systems of animals due to cerebral palsy. Most studies show the activation of microglia in various segments of the brain, especially in the white matter (corpus callosum, periventricular region, internal capsule and corona radiata)^{29,30,32,33}.

Activated microglia and oligodendrocytes promote neuronal injury, as occurs hypomyelination and neuronal loss in noble areas of the central nervous system^{29,33}. It is also observed an increase in the number and hypertrophy of astrocytes in multiple areas of the white matter, particularly in the periventricular area^{30,34,36}. These findings impair the blood supply and the availability of oxygen and glucose in the nerve tissue⁴⁸.

Coupled with the changes in the nervous system occur significant changes in the muscular system. In animals with CP was observed increased tone (spasticity) of the muscles of the anterior and posterior legs associated with postural abnormalities, righting deficits, changes in gait and reduced locomotor activity^{29,31,32,33,34,35}. The intensity, duration and quality of movements of the head, forelegs and hind legs have been reduced in these animals²⁷. The articles have observed that increased muscle tone relates to injury to the white matter observed in regions such as the internal capsule and corona radiata^{33,35}. Fadoua Saadani and colleagues²⁹ suggested that the increased muscle tone observed in animals CP is explained by the activation of microglia, especially in white matter brain. These motor deficits impair posture and mobility necessary for proper oral function.

Regarding the disorders in muscle orofacial functions was observed in animals subjected to CP induction, changes in sucking and swallowing reflexes^{29,31,32,33,35}. In children with CP occurs abnormalities in the maturation of muscle orofacial functions⁴⁸, hypertonia of the muscles that close the jaw⁴⁹, reduced bite during food intake force⁵⁰, weak suction⁴³, reducing the lip seal⁴², poor control of the lips and tongue⁴² and reduced pharyngeal motility⁴². These changes in the orofacial muscles contributed to incoordination of sucking and swallowing.

Our study has some limitations. For instance, the articles included evaluated different sensory and motor functions in experimental CP models. The variability in the group of orofacial functions evaluated occurred due to heterogeneities related mainly to the animal species and the CP induction method. Studies with rabbits have been used to evaluate a wider range of orofacial functions. However, studies using rats are more restricted in assessing the motor skills of the forepaws during feeding. Regarding the CP induction method, the hypoxia-ischemia models reproduce a larger spectrum of orofacial abnormalities compared to the other models. This can be

explained by the fact that hypoxia-ischemia provokes an injury in the myelination of sensory and motor nerve fibers, thus affecting the appearance of several sequels³¹.

Thus, the effects on the orofacial functions observed in the articles of this systematic review are similar to the typical clinical problems of CP. The impairment in orofacial functions limit growth, nutrition and general health of the child⁵⁰. In addition, studies show that depending on the degree of orofacial deficits, the prognosis of CP may be more reserved with increasing the mortality rate⁵¹. However, the current treatments proposed are ineffective in effectively minimizing orofacial dysfunctions affecting many of children in the world. In this context, this systematic review clarifies the adverse effects induced by experimental models of CP and some mechanisms underlying the alterations in the orofacial functions.

CONCLUSION

All CP experimental models analyzed modify the oral functions and periods in different species of animal life. The hypoxic-ischemia models cause changes in the sensory and motor orofacial functions in most of the parameters analyzed. However the inflammation model was more effective in playing a greater intensity of damage to the coordination of sucking and swallowing. Studies investigating the mechanisms underlying orofacial damage should be performed in order to optimize treatment strategies offered for children with CP and minimize orofacial damage inherent in this disorder.

ACKNOWLEDGEMENTS:

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The authors' contributions are as follows: Diego Cabral Lacerda, Kelli Nogueira Ferraz-Pereira, André Terácio, Raul Manhães de Castro and Ana Elisa Toscano conceived the study, designed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript; Bárbara Juacy Rodrigues Costa de Santana and Omar Guzman Quevedo contributed to the writing of the manuscript. All the authors read and approved the final version of the manuscript.

CONFLICTS OF INTERESTS

There are no conflicts of interest to declare.

REFERENCES

- 1- Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl* 2007; 109: 8–14.
- 2- Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P, Leviton A, Paneth N, Dan B, Jacobsson B, Damasio D. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Dev Med Child Neurol*. 2005; 47: 571-6.
- 3- Koman LA, Smith BP, Shilt JS. Cerebral palsy. *Lancet*. 2004; 363: 1619-31.
- 4- Yeargin-Allsopp M, Van Naarden Braun K, Doernberg NS, Benedict RE, Kirby RS, Durkin MS. Prevalence of cerebral palsy in 8-year-old children in three areas of the United States in 2002: a multisite collaboration. *Pediatrics* 2008; 121: 547–54.
- 5- Stanley FJ, Watson L. Trends in perinatal mortality and cerebral palsy in Western Australia, 1967 to 1985. *BMJ* 1992; 304: 1658–63.
- 6- Krigger KW. Cerebral palsy: an overview. *Am Fam Physician*. 2006; 73:91-100.
- 7- Gladstone M. A review of the incidence and prevalence, types and aetiology of childhood cerebral palsy in resource-poor settings. *Ann Trop Paediatr* 2010; 30: 181–96.
- 8- Krick J, Murphy-Miller P, Zeger S, Wright E. Pattern of growth in children with cerebral palsy. *J Am Diet Assoc*. 1996; 96: 680 – 685.
- 9- Novak I, Hines M, Goldsmith S, Barclay R. Clinical prognostic messages from a systematic review on cerebral palsy. *Pediatrics* 2012; 130: e1285–312.
- 10- De Jersey MC. An approach to the problems of orofacial dysfunction in the adult. *Aust J Physiother* 1975; 21: 5–10.
- 11-Brooks J, Day S, Shavelle R, Strauss D. Low weight, morbidity, and mortality in children with cerebral palsy: new clinical growth charts. *Pediatrics* 2011; 128: e299–307.
- 12-Stallings VA, Charney EB, Davies JC, Cronk CE. Nutritional status and growth of children with diplegic or hemiplegic cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 1993; 35: 997–1006.

- 13-Reid SM, McCutcheon J, Reddihough DS, Johnson H. Prevalence and predictors of drooling in 7- to 14-yearold children with cerebral palsy: a population study. *Dev Med Child Neurol* 2012; 54: 1032–6.
- 14-Parkes J, Hill N, Platt MJ, Donnelly C. Oromotor dysfunction and communication impairments in children with cerebral palsy: a register study. *Dev Med Child Neurol* 2010; 52: 1113–9.
- 15- Strauss DJ, Shavelle RM, Anderson TW. Life Expectancy of Children With Cerebral Palsy. *Pediatr Neurol.* 1998;18: 143 - 149.
- 16-Westbom L, Bergstrand L, Wagner P, Nordmark E. Survival at 19 years of age in a total population of children and young people with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2011; 53: 808–14.
- 17-Kakooza-Mwesige A, Tumwine JK, Eliasson AC, Namusoke HK, Forssberg H. Malnutrition is common in Ugandan children with cerebral palsy, particularly those over the age of five and those who had neonatal complications. *Acta paediatrica.* 2015 Dec;104(12):1259-68. PubMed PMID: 26088908. Pubmed Central PMCID: 5042112.
- 18-Rayhan MI, Khan MSH. Factors causing malnutrition in children under 5 in Bangladesh. *Pakistan J Nutr.* 2006;5:558-562.
- 19-Khan, N. Z., Ferdous, S., Munir, S., Huq, S. & McConachie, H. Mortality of urban and rural young children with cerebral palsy in Bangladesh. *Developmental Medicine and Child Neurology* 1998, 40,749–753.
- 20-Stallings VA, Charney EB, Davies JC, Cronk CE. Nutritional status and growth of children with diplegic or hemiplegic cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 1993; 35: 997–1006.
- 21- Sullivan, P. B., Juszczak, E., Lambert, B. R., Rose, M., Ford-Adams, M.E. & Johnson, A Impact of feeding problems on nutritional intake and growth: Oxford Feeding Study II. *Developmental Medicine and Child Neurology* 2002, 44, 461–467.
- 22-Gisel EG, Patrick J. Identification of children with cerebral palsy unable to maintain a normal nutrition state. *Lancet* 1988; 1: 283-286
- 23-Santos MT, Batista R, Previtali E, Ortega A, Nascimento O, Jardim J. Oral motor performance in spastic cerebral palsy individuals: are hydration and nutritional status associated? *J Oral Pathol Med* 2012; 41: 153–157.

- 24- Kuban KC, Leviton A. Cerebral palsy. *N Engl J Med* 1994; 330: 188–95.
- 25- Johnston V, Ferriero M, Vannucci J, Hagberg H. Models of Cerebral Palsy: Which Ones Are Best?. *J Child Neurol* 2005 20: 984.
- 26- Oliveira L.V.F. Da bancada ao leito: a partir de um diagnóstico preciso para o tratamento adequado. O uso crescente da pesquisa translacional. *ConScientiae Saúde* 2009;8:545-547.
- 27-Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group P. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Annals of internal medicine*. 2009 Aug 18;151(4):264-9, W64. PubMed PMID: 19622511.
- 28- Hooijams C.R., Leenaars M., Ritskes-Hoitinga. M. A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studie, to fully integrate the three Rs, and to make systematic reviews more feasible. *ATLA* 2010;38:167-182.
- 29-Saadani-Makki F, Kannan S, Lu X, et al. Intrauterine administration of endotoxin leads to motor deficits in a rabbit model: a link between prenatal infection and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199-651.
- 30-Chen A, Dimambro N, Clowry J. A comparison of behavioural and histological outcomes of periventricular injection of ibotenic acid in neonatal rats at postnatal days 5 and 7. *Brain Research* 2008.
- 31-Sidhartha Tan MD, Alexander Drobyshesky PhD, Tamas Jilling MD, Xinhai Ji MD, Lauren M. Ullman BS, Ila Englof BS, Matthew Derrick MBBS. Model of Cerebral Palsy in the Perinatal Rabbit. *J Child Neurol* 2005;20:972–979.
- 32-Matthew Derrick,Ning Ling Luo,Joanne C. Bregman,Tamas Jilling,Xinhai Ji,Kara Fisher,Candece L. Gladson,Douglas J. Beardsley,Geoffrey Murdoch,Stephen A. Back, Sidhartha Tan.The Journal of Neuroscience, January 7, 2004 • 24(1):24 –34.
- 33-Kannan S, Saadani-Makki F, Balakrishnan B, Chakraborty P, Janisse J, Lu X, Muzik O, Romero R, Chugani DC. Magnitude of [11 C]PK11195 Binding Is Related to Severity of Motor Deficits in a Rabbit Model of Cerebral Palsy Induced by Intrauterine Endotoxin Exposure. *Dev Neurosci* 2011;33:231–240.
- 34-Caroline O. Chua, MD; Halima Chahboune, PhD; Alex Braun, MD; Krishna Dummula, MD; Charles Edrick Chua; Jen Yu, MA; Zoltan Ungvari, MD, PhD; Ariel A. Sherbany, MD; Fahmeed Hyder, PhD; Praveen Ballabh, MD.

- Consequences of Intraventricular Hemorrhage in a Rabbit Pup Model. *Stroke*. 2009;40:3369-3377.
- 35-Matthew Derrick, MBBS; Alexander Drobyshevsky, PhD; Xinhai Ji, MD; Sidhartha Tan, MD. A Model of Cerebral Palsy From Fetal Hypoxia-Ischemia. *Stroke*. 2007;38[part 2]:731-735.
- 36-Janani Balasubramaniam, Mengzhou Xue, Richard J. Buist, Tammy L. Ivanko, Shannon Natuik, Marc R. Del Bigio. Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. *Experimental Neurology* 197 (2006) 122 – 132.
- 37-Alexander Drobyshevsky, Lei Yu, Yirong Yang, Syed Khalid, Kehuan Luo, Rugang Jiang, Haitao Ji, Matthew Derrick, Leslie Kay, Richard B. Silverman, Sidhartha Tan. Antenatal insults modify newborn olfactory function by nitric oxide produced from neuronal nitric oxide synthase *Experimental Neurology* 237 (2012) 427–434.
- 38-Alexander Drobyshevsky, Alan M. Robinson, Matthew Derrick, Alice M. Wyrwicz, Xinhai Ji, Ila Englof, Sidhartha Tan. Sensory deficits and olfactory system injury detected by novel application of MEMRI in newborn rabbit after antenatal hypoxia–ischemia. *NeuroImage* 32 (2006) 1106–1112.
- 39-Reddiough, D. S., Baikie, G. & Walstab, J. E. (2001) Cerebral palsy in Victoria, Australia: mortality and causes of death. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 37, 183–186.
- 40-Reid SM, Carlin JB, Reddiough DS. Survival of individuals with cerebral palsy born in Victoria, Australia, between 1970 and 2004. *Dev Med Child Neurol* 2012; 53:53–60.
- 41-Brooks J, Day S, Shavelle R, Strauss D. Low weight, morbidity, and mortality in children with cerebral palsy: new clinical growth charts. *Pediatrics* 2011; 128: e299–307.
- 42- Santos M. T., Batista R., Previtali E., Ortega A., Nascimento O., Jardim J. Oral motor performance in spastic cerebral palsy individuals: are hydration and nutritional status associated? *J Oral Pathol Med* 41: 153–157, 2012.
- 43- Reilly S, Skuse D. Characteristics and Management of Feeding of Young Children with Cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol*. 1992; 34: 379-388.

- 44- Redstone F, West JF. The Importance of Postural Control for Feeding. Pediatr Nurs. 2004 Mar-Apr;30(2):97-100.
- 45-Calis EA, Veugelers R, Rieken R, Tibboel D, Evenhuis HM, Penning C. Energy intake does not correlate with nutritional state in children with severe generalized cerebral palsy and intellectual disability. *Clin Nutr*; 29: 617–21, 2010.
- 46-Weir K. A., Bell K. L., Caristo F., et al. Reported Eating Ability of Young Children With Cerebral Palsy: Is There an Association With Gross Motor Function? *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 94:495-502, 2013.
- 47-Benfer KA, Weir KA, Bell KL, Ware RS, Davies PS, Boyd RN. Oropharyngeal dysphagia and gross motor skills in children with cerebral palsy. *Pediatrics* 2013; 131: e1553–62.
- 48-Benfer KA, Weir KA, Bell KL, et al. Longitudinal cohort protocol study of oropharyngeal dysphagia: relationships to gross motor attainment, growth and nutritional status in preschool children with cerebral palsy. *BMJ Open*;001460, 2012.
- 49- Ortega O. L., Guimaraes A. S., Ciamponi A. L., Marie S. K. N. Frequency of temporomandibular disorder signs in individuals with cerebral palsy. *Journal of Oral Rehabilitation*. 35; 191–195, 2008.
- 50-Krick J, Van Duyn MA. The relationship between oral-motor involvement and growth: a pilot study in a pediatric population with cerebral palsy. *Journal of the American Dietetic Association*. 1984 May;84(5):555-9. PubMed PMID: 6715752.
- 51-Sullivan PB, Lambert B, Rose M, Ford-Adams M, Johnson A, Griffiths P. Prevalence and severity of feeding and nutritional problems in children with neurological impairment: Oxford Feeding Study. *Developmental medicine and child neurology*. 2000 Oct;42(10):674-80. PubMed PMID: 11085295.

Table 1: Bioterium quality conditions evaluated by the items highlighted by Hooijman's et al., 2010.

Author/ Year	Accommodation	Lighting	Temperature	Water/diet	Code of ethics
Fadoua Saadani et al., 2008 ²⁹	-	-	+	+	+
Aiqing Chen et al., 2008 ³⁰	-	-	-	-	+
Sidhartha Tan et al., 2005 ³¹	+	-	+	+	-
Mathew Derrick et al., 2004 ³²	+	-	+	-	+
Sujatha Kannan et al., 2011 ³³	+	-	-	-	+
Caroline O. Chua et al., 2015 ³⁴	-	-	+	+	+
Matthew Derrick et al., 2007 ³⁵	-	-	-	-	-
Janani Balasubramaniam et al., 2006 ³⁶	+	+	-	+	+
Alexander Drobyshevsky et al., 2012 ³⁷	-	-	-	-	+
Alexander Drobyshevsky et al., 2006 ³⁸	-	-	-	-	-

Table 2: Characterization of the sample and the results found in models of inflammation.

Author/ Year	Animal (Specie)	CP Model	Induction Period	Age Assessment	Results
Fadoua Saadani et al., 2008²⁹	Rabbit	Inflammation (LPS administration)	Gestational period (28 th day of pregnancy)	1 th day of postnatal life	1-Incoordination of sucking and swallowing. 2- Reduction of head movements during feeding.
Aiqing Chen et al., 2008³⁰	Rat (<i>Wistar</i>)	Inflammation (LPS administration)	Pós-natal period (5 th or 7 th day of postnatal life)	From to 28 th day of postnatal life	1-Failure to achieve and acquire food.
Sujatha Kannan et al, 2011³³	Rabbit	Inflammation (LPS administration)	Gestational period (28 th day of pregnancy)	1 th day of postnatal life	1-Incoordination of sucking and swallowing

Table 3: Sample Characterization and results found for intraventricular hemorrhage models.

Author/ Year	Animal (Specie)	CP Model	Induction period	Age assessment	Results
Caroline O. Chua et al., 2015³⁴	Rabbit	Intraventricular hemorrhage (Autologous blood infusion)	Neonatal period (two hours of life)	14 th day of postnatal life	1-No damage was observed.
Janani Balasubramaniam et al., 2006³⁶	Rat (<i>Sprague dawley</i>)	Intraventricular hemorrhage (Autologous blood infusion)	Neonatal period (24-36hrs at the 1 th day of postnatal life)	70 th day of postnatal life	1- Failure to achieve and acquire food.

Table 4: Characterization of the sample and results found in hypoxia-ischemia models

Author/ Year	Animal (Species)	CP Model	Induction Period	Age Assessment	Results
Sidhartha Tan et al., 2005³¹	Rabbit	Hypoxia-ischemia	Gestational period intermediate (21 th , 22 th and 25 th days of pregnancy) and final (28 th and 29 th days of pregnancy)	1 th day of postnatal life	1- Incoordination of sucking and swallowing. 2-Impaired olfactory aversive response. 3- Reduction of head movements during feeding.
Mathew Derrick et al., 2004³²	Rabbit	Hypoxia-ischemia	Gestational period (21 th and 22 th days of pregnancy)	1 th day of postnatal life	1- Incoordination of sucking and swallowing. 2- Reduction of head movements during feeding.

Matthew Derrick et al., 2007³⁵	Rabbit	Hypoxia- ischemia	Gestational period (21 th and 22 th or 29 th days of pregnancy)	1 th day of postnatal life	1- Incoordination of sucking and swallowing. 2- Impaired olfactory aversive response.
Alexander Drobyshevsky et al., 2012³⁷	Rabbit	Hypoxia- ischemia	Gestational period (22 th day of pregnancy)	1 th day of postnatal life	1- Impaired olfactory aversive response.
Alexander Drobyshevsky et al.,2006³⁸	Rabbit	Hypoxia- ischemia	Gestational period (22 th day of pregnancy)	1 th day of postnatal life	1- Impaired olfactory aversive response.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

 **Universidade Federal de Pernambuco**
Centro de Biociências
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 15 de abril de 2016.

Ofício nº 24/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**
Departamento de Nutrição
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº CEUA 0005/2015

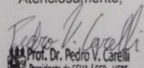
Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **"Paralisia cerebral experimental: eventuais consequências da inibição farmacológica da recaptação da serotonina sobre o desenvolvimento somático, sensório-motor e da atividade locomotora"**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição - CCS/UFPE; Animais: ratos heterogênicos Wistar; Idade: 90-120 dias; Peso: 220-250g; Sexo: machos e fêmeas; Nº total de animais a ser utilizado: 62 (42 machos e 20 fêmeas) ratos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carreira
Presidente da CEUA / CCS - UFPE
UFPE SIAPE 1.801.584

ANEXO B – FICHA DE AVALIAÇÃO DOS REFLEXOS

NINHADA Nº: _____

GRUPO DE ESTUDO: _____

DNF: / /

MARCAÇÃO DO FILHOTE: _____

[illegible]

ANEXO C – FICHA DE AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO

NINHADA Nº: _____

GRUPO DE ESTUDO: _____

DNF: / /

MARCAÇÃO DO FILHOTE: _____

[illegible]