



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

HENRIQUE JOSÉ CAVALCANTI BEZERRA GOUVEIA

**O TRATAMENTO NEONATAL COM L-TRIPTOFANO PODE REDUZIR OS DANOS
CRANIOFACIAIS, SOMÁTICOS E ENCEFÁLICOS EM RATOS COM
MICROCEFALIA?**

Recife
2019

HENRIQUE JOSÉ CAVALCANTI BEZERRA GOUVEIA

**O TRATAMENTO NEONATAL COM L-TRIPTOFANO PODE REDUZIR OS DANOS
CRANIOFACIAIS, SOMÁTICOS E ENCEFÁLICOS EM RATOS COM
MICROCEFALIA?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

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

Coorientadora: Prof^a. Dra. Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro.

Recife

2019

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

G719p Gouveia, Henrique José Cavalcanti Bezerra
O tratamento neonatal com L-triptofano pode reduzir os danos craniofaciais, somáticos e encefálicos em ratos com microcefalia?/ Henrique José Cavalcanti Bezerra Gouveia. – Recife: o autor, 2019.
73 f.; il.

Orientador: Raul Manhães de Castro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Nutrição.
Inclui referências e anexo.

1. Microcefalia. 2. Triptofano. 3. Serotonina. 4. Crescimento e Desenvolvimento. 5. Ontogênese de reflexos. I. Manhães de Castro, Raul (orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 136)

HENRIQUE JOSÉ CAVALCANTI BEZERRA GOUVEIA

**O TRATAMENTO NEONATAL COM L-TRIPTOFANO PODE REDUZIR OS DANOS
CRANIOFACIAIS, SOMÁTICOS E ENCEFÁLICOS EM RATOS COM
MICROCEFALIA?**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Nutrição da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Nutrição.

Aprovada em: 19 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Elizabeth do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Sandra Lopes de Souza
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Giselia Santana Muniz
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Raul Otoni e Elilena Cavalcanti**, por fazerem o possível e o impossível para que eu pudesse atingir meus objetivos. A minha irmã, **Rebeca Cavalcanti** e ao meu irmão de 4 patas, **Floki**, pela companhia durante o processo.

Ao meu amigo **Georgio Kokkosi** por me apresentar a Professora **Silvana Magalhães**, que prontamente se disponibilizou a ajudar e explicar o que eu precisava saber sobre o mestrado, quando eu estava indeciso sobre qual área seguir profissionalmente.

A Professora **Raquel Aragão** por ter me ajudado e permitido que eu me inscrevesse no módulo de “fisiologia da nutrição” quando eu fui à federal pela primeira vez. Isso definitivamente me ajudou a decidir que eu queria fazer mestrado.

Ao meu orientador, Professor **Raul Manhães de Castro**, por ter me dado à oportunidade de fazer parte de um grupo de pesquisa, mesmo tendo me visto apenas uma vez, quando eu achava que seria muito difícil fazer parte de uma unidade de estudo de um departamento onde ninguém me conhecia. Agradeço também pelas orientações e conselhos durante todo o período.

A minha coorientadora, Professora **Ana Elisa Toscano**, pelas orientações e por sempre estar disposta a ajudar.

A todas as outras professoras do grupo de pesquisa: **Kelli Ferraz, Lígia Galindo e Isabeli Lins**, pelos ensinamentos durante o processo.

A **Tássia Karin**, por ter me ajudado na escrita de artigos e da dissertação, além das orientações teóricas e práticas com relação ao biotério. A **Diego Lacerda** e **Manuella da Luz** por me ajudarem na preparação de aulas durante o estágio a docência e pelos ensinamentos. As minhas amigas e companheiras de biotério **Bárbara Santana** e **Carolina Mendonça**, pela convivência e ajuda no dia-a-dia, o que tornou todo o processo mais fácil e divertido. A **Carolina Cadete**, que sempre se disponibilizou a ler e me ajudar a corrigir tudo que eu escrevia, além das conversas aleatórias que geraram muitas risadas no dia-a-dia. A **Sabrina Pereira**, que sempre se disponibilizou a me ajudar, especialmente no final do mestrado, quando o tempo era curto e muita coisa tinha que ser feita. A todos os outros amigos do grupo de pesquisa ou da turma do mestrado: **Thaynan Raquel, Jacqueline Silva, André Terácio, Paula Brielle, Glayciele Albuquerque, Diego Visco, Luana Olegário, Wenícios Chaves, Lucélia Oliveira, Erika Cadena, Luana Monteiro, Kássia Oliveira, Kelly Rayanne, Gabriel Tavares, Ially Fabiane e Luana D’arc**, pelo companheirismo e pelas ajudas durante o processo.

Aos meus amigos **Carlos Nakadaira, Murilo José e Myruska Vilela**, pelo companheirismo em todos os momentos.

Aos professores da Pós-graduação em Nutrição (**Prof. Alcides da Silva, Prof. Ângela Amâncio, Prof. Carol Virgínia, Prof. Elizabeth do Nascimento, Prof. Raquel da Silva, Prof. Rubem Carlos, Prof. Thayza Christina, Prof. Raquel Santana, Prof. Antonio Santos, Prof. Kelli Ferraz, Prof. Amanda, Prof. Rhowena, Prof. Carlos e Prof. Surama**) pelos ensinamentos.

As professoras **Elizabeth do Nascimento, Sandra Lopes de Souza e Giselia Santana Muniz** pelas contribuições durante o exame de qualificação.

A coordenação da Pós-graduação em Nutrição, em especial a **Cecília Arruda e Andréa Nascimento**, sempre dispostas a ajudar e resolver os problemas.

Aos responsáveis pelo Biotério de criação do Departamento de Nutrição **Dr. Edeones França e Bruno**, pelos ensinamentos sobre os cuidados com os animais e pelos animais disponibilizados para a pesquisa.

Por fim, a **Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de PE (FACEPE)** e a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro.

RESUMO

A microcefalia é considerada um achado clínico que pode ser resultado de anomalias congênitas ou decorrer de insultos após o parto. Estudos com modelos experimentais de microcefalia constataram que o sistema serotoninérgico apresenta-se afetado nesta condição. A administração de triptofano ocasiona aumento do triptofano no cérebro, assim como de serotonina, que possui papel no humor, comportamento e ingestão alimentar, além de múltiplas funções durante o desenvolvimento precoce e a morfogênese craniofacial. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento neonatal com L-triptofano sobre a evolução das sequelas craniofaciais, somáticas e encefálicas em ratos submetidos a um modelo experimental de microcefalia. Foram utilizados filhotes (machos e fêmeas) de ratos da linhagem Wistar obtidos através de 24 ratas Wistar adultas. Após a confirmação da gestação, foram formados aleatoriamente três grupos de gestantes: Controle (C, n=8); Azeite (A, n=8); Busulfan (B, n=8). Após o nascimento, os filhotes (n=230) de cada ninhada foram subdivididos em dois grupos submetidos até o 21º dia pós-natal à dose diária (via subcutânea) de: Salina (10mL/kg, 10µl/g) ou Triptofano (10mg/kg, 10µl/g). Foram avaliados: indicadores murinométricos do desenvolvimento, características somáticas, ontogênese de reflexos, medidas craniofaciais e histologia do córtex somatossensorial. Os filhotes do grupo B apresentaram redução significativa do eixo látero-lateral em todo período de lactação. Além disso, houve redução do eixo ântero-posterior a partir do dia 5. No primeiro dia, utilizando o ponto de corte determinado, todos os animais do grupo B foram classificados como microcefálicos. Os filhotes do grupo B apresentaram redução de peso significativa nos dias 19 e 21, retardo no desaparecimento da preensão palmar e na maturação da recuperação de decúbito, colocação pelas vibrissas e queda livre, além de retardo na erupção dos incisivos superiores e inferiores. Com relação às medidas craniofaciais realizadas no dia 28 pós-natal, houve diferença significativa nas medidas do crânio (L1, L2, L3 e L9) e da mandíbula (L4, L5 e L6) do grupo B. Além disso, houve redução no número e na área de neurônios do córtex somatossensorial primário. Não se observou efeito do triptofano em nenhum dos parâmetros avaliados. A exposição ao L-triptofano durante o

período de lactação não influenciou o desenvolvimento dos animais em nenhum dos parâmetros analisados. Por outro lado, a exposição ao Busulfan ocasionou redução dos eixos cranianos, atraso na maturação de reflexos e características somáticas, redução das medidas craniofaciais e diminuição da área e número dos neurônios do córtex somatossensorial.

Palavras-chave: Microcefalia. Triptofano. Serotonina. Crescimento e Desenvolvimento. Ontogênese de reflexos.

ABSTRACT

Microcephaly is a clinical symptom that can be the result of congenital anomalies or post-partum insults. Studies with experimental models of microcephaly have shown that the serotonergic system is affected in this condition. The administration of tryptophan causes an increase in tryptophan in the brain, as well as serotonin, which has a role in mood, behavior and food intake, as well as multiple functions during early development and craniofacial morphogenesis. Thus, the objective of this study was to evaluate the effect of neonatal treatment with L-tryptophan on the evolution of craniofacial, somatic and encephalic sequels in rats submitted to an experimental model of microcephaly. Pups (male and female) obtained from 24 adult female Wistar rats adult were used. After confirming the gestation, three groups of pregnant were randomly formed, based on the pharmacological induction of microcephaly: Control (C, n = 8); Olive oil (A, n = 8); Busulfan (B, n = 8). After birth, pups (n=230) from each litter were subdivided into two groups submitted to the daily dose (subcutaneously) of Salina (10mL/kg, 10µl/g) or Tryptophan (10mg/kg, 10µl/g). The following parameters were evaluated: somatic growth, physical features, reflex-ontogeny, craniofacial measurements and histology of primary somatosensory cortex. The pups of group B presented significant reduction of the latero-lateral axis throughout entire lactation period. In addition, there was reduction of the anteroposterior axis from day 5 in the same period. On the first day, using the determined cutoff point, all animals in group B were classified as microcephalic. The offspring of group B showed significant weight reduction on days 19 and 21, delayed disappearance of palmar grip and delayed maturity of righting, vibrissa placing and free-fall righting, as well as delayed eruption of the upper and lower incisors. Regarding the craniofacial measurements performed on the 28th postnatal period, there were significant differences in the measurements L1, L2, L3 and L9, which represent measurements of the skull, and L4, L5 and L6, which represent measurements of the mandible. In addition, there was a reduction in the number and area of neurons in the primary somatosensory cortex. There was no effect of tryptophan on any of the parameters evaluated. Exposure to L-tryptophan during the lactation period did not influence the development of the animals in any of

the analyzed parameters. On the other hand, exposure to Busulfan caused reduction in cranial axes, delay in reflexes and physical features maturation, reduction of craniofacial measurements and reduction of area and numbers of neurons of the somatosensory cortex.

Keywords: Microcephaly. Tryptophan. Serotonin. Growth and Development. Reflex-ontogeny.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Estrutura química da serotonina.....	25
Figura 2 -	Síntese da serotonina a partir do triptofano.....	28
Figura 3 -	Degradação da serotonina em humanos e roedores.....	29
Figura 4 -	Delineamento experimental.....	36
Figura 5 -	Eixo látero-lateral e Eixo ântero-posterior.....	37
Figura 6 -	A. Medidas craniofaciais e mandibulares nos planos transversal e sagital. B. Imagens representativas do crânio e mandíbula nos planos transversal e sagital.....	40
Figura 7 -	Efeito da intervenção com triptofano sobre a evolução dos eixos cranianos no período de lactação.....	43
Figura 8 -	Efeito da intervenção com triptofano sobre a evolução do peso corporal no período de lactação.....	44
Figura 9 -	Efeito da intervenção com triptofano sobre o número de neurônios e células da glia.....	47
Figura 10 -	Efeito da intervenção com triptofano sobre a área e perímetro de neurônios e células da glia.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito da intervenção com triptofano na ontogênese de reflexos e características somáticas nos diferentes grupos.....	45
Tabela 2 -	Efeito da intervenção com triptofano nas medidas craniofaciais no 28º dia de vida nos diferentes grupos.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Azeite
AO	Abertura ocular
AP	Aversão ao precipício
AS	Azeite salina
AT	Azeite triptofano
B	Busulfan
BH	Bar holding
BS	Busulfan salina
BT	Busulfan triptofano
C	Controle
CS	Controle salina
CT	Controle triptofano
CV	Colocação pelas vibrissas
EAPC	Eixo ântero-posterior do crânio
EII	Erupção dos incisivos inferiores
EIS	Erupção dos incisivos superiores
ELLC	Eixo látero-lateral do crânio
GN	Geotaxia negativa
ISRS	Inibidores seletivos da recaptação de serotonina
L-TRI	L-Triptofano
MAO	Monoamina oxidase
NADH	Adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
PBS	Salina tamponada fosfatada
PP	Preensão palmar
QL	Queda livre
RD	Recuperação de decúbito
RS	Resposta ao susto
SNC	Sistema nervoso central

S1	Córtex somatossensorial primário
5-HIAL	5-hidroxi-indol-acético
5-HITCA	Ácido carboxílico tiazolidina 5-hidroxi-indol
5-HT	Serotonina
5-HTOL	5-hidroxi-triptofol
5-HTP	5-Hidroxitriptofano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	PLASTICIDADE FENOTÍPICA NO PERÍODO CRÍTICO DE DESENVOLVIMENTO.....	19
2.2	MICROCEFALIA.....	21
2.3	CAUSAS E MODELOS EXPERIMENTAIS DE MICROCEFALIA.....	23
2.4	SISTEMA SEROTONINÉRGICO E MICROCEFALIA.....	24
2.5	TRIPTOFANO E PRODUÇÃO DA SEROTONINA.....	26
2.6	MANIPULAÇÃO DIETÉTICA E FARMACOLÓGICA DE TRIPTOFANO/SEROTONINA.....	29
3	HIPÓTESE.....	32
4	OBJETIVOS.....	33
4.1	OBJETIVO GERAL.....	33
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
5	MÉTODOS.....	34
5.1	LOCAL DO ESTUDO.....	34
5.2	ANIMAIS.....	34
5.3	DELIMITAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	35
5.4	ANÁLISES EXPERIMENTAIS.....	37
5.4.1	Avaliações in vivo.....	37
5.4.2	Estudo dos indicadores murinométricos do desenvolvimento.....	37
5.4.3	Diagnóstico do dano encefálico (microcefalia).....	38
5.4.4	Desenvolvimento das características somáticas.....	38
5.4.5	Avaliação da ontogênese de reflexos.....	38
5.4.6	Medidas dos parâmetros craniofaciais.....	39
5.4.7	Análise morfométrica do córtex cerebral.....	41
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
6	RESULTADOS.....	43
7	DISCUSSÃO.....	49
8	CONCLUSÕES.....	56
8.1	PERSPECTIVAS.....	56

REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO A – PARECER Nº 0003/2017 CEUA – UFPE.....	73

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento humano é um processo complexo e compreende uma série de mudanças que se iniciam na fecundação (MOORE; PERSAUD, 2008). O mesmo é contínuo e passível de interferências ambientais que modulam os fenótipos expressos pelo indivíduo. Esta capacidade evolutiva é chamada de plasticidade fenotípica, que se baseia na habilidade de um genótipo de apresentar fenótipos distintos mediante exposição a diferentes condições ambientais (GARLAND; KELLY, 2006; PIGLIUCCI *et al.*, 2006). As interações genótipo-ambiente causam impacto ainda maior no organismo no início da vida (GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007). Nesta fase, a exposição a fatores ambientais nocivos, como infecções, desnutrição, álcool e diversas outras substâncias químicas, pode levar ao acometimento de microcefalia e outras condições neurológicas, como a paralisia cerebral (FURUKAWA *et al.*, 2007; ASHWAL *et al.*, 2009).

A microcefalia é considerada um achado clínico que pode ser desenvolver na gestação (primária) ou após o nascimento (secundária) (WOODS; PARKER, 2013). Ambos os tipos podem decorrer de injúrias ou desordens genéticas que afetam a função cerebral e o crescimento perinatal (WOODS; PARKER, 2013). O seu diagnóstico é realizado através do perímetro cefálico na primeira semana de vida (até 6 dias e 23 horas) em comparação à média específica por sexo e idade gestacional do bebê (WHO, 2014). As crianças com microcefalia associada às síndromes congênitas podem apresentar retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia, irritabilidade, transtornos oculares e persistência de reflexos primitivos (ASHWAL *et al.*, 2009; ARAGAO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SCHULER *et al.*, 2016; VAN DER LINDEN *et al.*, 2016). Além disso, podem apresentar anormalidades cerebrais como malformações corticais severas, lisencefalia, ventriculomegalia, hipoplasia cerebelar e hipodensidade da substância branca (MARTINES *et al.*, 2016; SCHULER *et al.*, 2016; ARAGAO *et al.*, 2016; HAZIN *et al.*, 2016).

Estudos com modelos experimentais de microcefalia constataram que o sistema serotoninérgico se apresenta prejudicado nesta condição, caracterizado por desenvolvimento anormal das fibras nervosas serotoninérgicas e liberação atrasada

de serotonina durante o desenvolvimento do córtex (FUNAHASHI *et al.*, 1998; UEDA *et al.*, 1999). Em ratos, um rápido aumento nos níveis de serotonina é observado no período pós-natal, atingindo os níveis de adulto na terceira semana de vida (LIDOV; MOLLIVER, 1982). O período desse evento está intimamente relacionado com os períodos onde ocorre a sinaptogênese (1º ao 21º dia pós-natal) e neurogênese cortical (até o 15º dia) (PRESSLER; AUVIN, 2013; SEMPLE *et al.*, 2013). Assim, a deficiência deste sistema no período de lactação pode comprometer o desenvolvimento do SNC. Por outro lado, a administração de triptofano, aminoácido essencial precursor da serotonina, ocasiona aumento do triptofano no cérebro, assim como de serotonina (HALEEM *et al.*, 1998; FERNSTROM; WURTMAN, 1972). Os neurônios serotoninérgicos fazem parte de um dos sistemas mais amplamente distribuídos no cérebro de mamíferos (SODHI; SANDERS-BUSH, 2004), sendo um dos principais sistemas envolvidos no desenvolvimento das estruturas orofaciais e corticais (BUZNIKOV *et al.*, 1996; VITALIS; PARNAVELAS, 2003). Desta forma, sugere-se que a utilização desse aminoácido pode facilitar a neurotransmissão serotoninérgica e ser útil no tratamento de condições que cursam com deficiência de serotonina (HALEEM, 2017).

Entretanto, doses maiores de triptofano (70-200mg/kg) podem estar relacionadas com efeitos indesejados como tremor, náusea e tonturas (FERNSTROM *et al.*, 2012). Efeitos negativos também foram observados após a utilização de fármacos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (DEIRÓ *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2004; DEIRÓ *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2010). A síndrome da serotonina, condição ocasionada pelo excesso de atividade da serotonina nos receptores periféricos e centrais, pode ser diagnosticada em alguns casos, principalmente quando o triptofano é administrado junto com fármacos (STERNBACH, 1991; MARTIN, 1996; VOLPI-ABADIE; FERNSTROM *et al.*, 2012; KAYE; KAYE, 2013). Os sintomas da síndrome da serotonina incluem agitação, delírio, coma, midríase, sudorese, hipertermia, tremor, rigidez e mioclonia (STERNBACH, 1991; MARTIN, 1996). Assim, os resultados sugerem que a utilização de altas doses de triptofano e/ou fármacos que visam o aumento da atividade da serotonina pode estar relacionada com efeitos negativos, associados possivelmente com a síndrome da serotonina.

Tendo em vista o papel do triptofano e da serotonina na modulação da plasticidade fenotípica, bem como a necessidade de amenizar os danos em pacientes com prejuízos associados à microcefalia, torna-se pertinente a realização de um estudo experimental que avalie o efeito do triptofano ofertado no período crítico do desenvolvimento sobre indicadores do desenvolvimento. Assim, o presente estudo tem como objetivo, avaliar em modelo experimental de microcefalia, os efeitos da utilização de baixa dose de triptofano durante a lactação, sobre o desenvolvimento das características somáticas, maturação de reflexos e estrutura craniofacial e encefálica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLASTICIDADE FENOTÍPICA NO PERÍODO CRÍTICO DE DESENVOLVIMENTO

Nos mamíferos, há períodos do desenvolvimento dos sistemas fisiológicos que são muito mais vulneráveis aos insultos ambientais, físicos, químicos e biológicos (RICE; BARONE, 2000). Esses períodos são dependentes de processos celulares críticos, tais como, proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose no que diz respeito ao desenvolvimento neural (RICE; BARONE, 2000). Pesquisas no campo da plasticidade neural têm destacado a influência que as alterações ambientais podem exercer sobre a atividade deste sistema em indivíduos durante a fase precoce do desenvolvimento e suas repercussões em longo prazo (JONES; DYSON, 1981). Desta forma, distúrbios neurológicos podem ser resultantes de uma agressão ambiental ocorrida durante o desenvolvimento cerebral do feto (BAX *et al.*, 2005), como é o caso da microcefalia (VICTORIA *et al.*, 2016).

Contudo, os seres vivos também possuem a capacidade de reagir com adaptações genéticas bioquímicas, fisiológicas e morfológicas aos distintos insultos do meio ambiente (WEST-EBERHARD, 1986; PIGLIUCCI *et al.*, 2006). Esta capacidade tem se mostrado vantajosa na maioria das espécies animais e vegetais, por possibilitar o aumento do nicho das espécies e garantir maior sobrevivência e sucesso reprodutivo destas (WEST-EBERHARD, 1986; WEST-EBERHARD, 2003). Neste cenário, surge o conceito de plasticidade fenotípica, onde um genótipo, a depender da particular interação com o meio ambiente, pode expressar mais de um fenótipo, modificando a sua forma, estado, movimento ou padrão de atividade (GARLAND; KELLY, 2006; PIGLIUCCI *et al.*, 2006). O fenótipo de um indivíduo é a expressão última da interação do seu genótipo (conjunto de genes) e do ambiente (WEST-EBERHARD, 1986; WEST-EBERHARD, 2003; PIGLIUCCI *et al.*, 2006).

O estabelecimento do fenótipo nos mamíferos tem na fase perinatal de crescimento e desenvolvimento um período vulnerável a múltiplos fatores ambientais, por conseguinte, alguns pesquisadores o consideram “preditor” de

consequências que se manifestarão a curto ou a longo-prazo, inclusive na vida adulta (GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007). Corroborando o conjunto de proposições acima mencionadas, estudos epidemiológicos e experimentais demonstraram que variações ambientais na vida precoce podem ocasionar mudanças fenotípicas com repercussões permanentes no metabolismo, estrutura e função dos sistemas fisiológicos (HALES *et al.*, 1991; TOSCANO *et al.*, 2008), como ocorre na microcefalia (VICTORIA *et al.*, 2016). De fato, muitas alterações associadas com modificações permanentes na expressão gênica são reguladas por mecanismos epigenéticos (GLUCKMAN; HANSON, 2006).

O termo epigenética significava, em suas origens, aos mecanismos que ligam os genes aos fenótipos. Entretanto, nos últimos anos, seu conceito foi minuciosamente definido como modificações no DNA e na cromatina que não ocasionam modificações na sequência de bases nitrogenadas do DNA, mas que ocasionam mudanças na expressão de um gene (EGGER *et al.*, 2004; DUNCAN; GLUCKMAN; DEARDEN, 2014). Através destas alterações na expressão de um gene, os mecanismos epigenéticos possuem a capacidade de definir e alterar o fenótipo celular (DUNCAN; GLUCKMAN; DEARDEN, 2014). Tendo em vista que o epigenoma é sensível às modificações ambientais (GERTZ *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012), os mecanismos epigenéticos podem ocasionar regulações dinâmicas do genoma em resposta às variações ambientais (DUNCAN; GLUCKMAN; DEARDEN, 2014). Além disso, mecanismos epigenéticos também podem mediar mecanismos relacionados à compensação de dose, silenciamento de cromossomos e marcação (imprinting) genética (TRESCOT *et al.*, 2006; WUTZ; GRIBNAU, 2007; ABRAMOWITZ; BARTOLOMEI, 2012; GERTZ *et al.*, 2013). É importante citar que as modificações ocasionadas no genoma através dos mecanismos epigenéticos podem ser herdadas pela mitose (TANG; HO, 2007).

Os principais mecanismos epigenéticos são: metilação de DNA, alterações nas histonas e ligação com RNAs não codificantes (D'ALESSIO; SZYF, 2006; DUNCAN; GLUCKMAN; DEARDEN, 2014). O processo de metilação envolve a participação de enzimas denominadas DNA metiltransferases, que transferem o grupamento metil para bases de citosina (mais frequente) localizadas nos pares dinucleotídeo nas denominadas ilhas CpG's (Citosina-fosfato-Guanina) (FEINBERG,

2001; DUNCAN; GLUCKMAN; DEARDEN, 2014). Esta metilação pode interferir na expressão de genes, por exemplo, ao impossibilitar o reconhecimento das ilhas pelos fatores de transcrição, resultando em silenciamento do gene (COMB; GOODMAN, 1990; PRENDERGAST; LAW; ZIFF, 1991). As histonas, por sua vez, são as principais proteínas presentes no nucleossomo, com importante papel no empacotamento do DNA e na regulação da expressão dos genes (DUNCAN; GLUCKMAN; DEARDEN, 2014). O processo de modificações nas histonas envolve as enzimas que realizam acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinilação, sumoilação e Poli-ADP-Ribosilação (BIEL; WASCHOLOWSKI; GIANNIS, 2005). Estas enzimas interferem na afinidade das histonas com a fita de DNA, influenciando o grau de empacotamento do mesmo, vindo a facilitar ou dificultar a expressão de genes, quando esta afinidade é aumentada ou diminuída, respectivamente (BIEL; WASCHOLOWSKI; GIANNIS, 2005). Os RNAs não codificantes, correspondem a moléculas de RNA que não se destinam a tradução em proteínas, entretanto, ao reconhecerem e se ligarem a região promotora dos genes, podem inibir suas transcrições ou mesmo reduzir a estabilidade molecular (WEI *et al.*, 2017). Por fim, é importante destacar que evidências suportam cada vez mais uma estreita relação entre o padrão de metilação do DNA e modificações de histonas, apoiando a ideia de que esses mecanismos agem em conjunto para regular a expressão gênica (DUNCAN; GLUCKMAN; DEARDEN, 2014).

2.2 MICROCEFALIA

A microcefalia é considerada um achado clínico que pode ser resultado de anomalias congênitas (primária) ou se desenvolver após o parto (secundária) (WOODS E PARKER, 2013). Em ambos, as causas podem ser genéticas ou ambientais, ocorrendo por duas razões: o cérebro não se desenvolve de forma adequada ou há uma interrupção do seu desenvolvimento (ABUELO, 2007). Algumas causas ambientais e genéticas incluem: encefalopatia hipóxico-isquêmica, acidentes vasculares, infecções intrauterinas, álcool, radiação, fenilcetonúria materna e as síndromes de Rett e de Angelman (ABUELO, 2007). Em humanos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2014), o critério

epidemiológico para diagnóstico da microcefalia é a medida da circunferência cranial fronto-occipital durante a primeira semana de vida (WHO, 2014). Valores dessa circunferência menores que -2 desvios-padrões abaixo da média específica para o sexo e idade gestacional confirmam o diagnóstico (WHO, 2014). Entretanto, crianças sem a presença de microcefalia também podem apresentar consequências relacionadas aos agentes teratogênicos (FRANÇA *et al.* 2016; VAN DER LINDEN *et al.* 2016). Por essa razão, o Ministério da Saúde recomenda a inclusão de novos critérios, como perda de visão, audição e comprometimento ou deficiência de membros para diagnosticar os danos causados por agentes teratogênicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017a).

No Brasil, de 2000 a 2014, o coeficiente de prevalência da microcefalia foi de 5 casos para cada 100 mil recém-nascidos, entretanto, a partir de julho de 2015, houve um aumento inesperado dos casos de crianças com microcefalia (MARINHO *et al.*, 2016). O coeficiente de prevalência da microcefalia no Brasil em 2015 foi de 54.6 casos para cada 100 mil recém-nascidos, sendo a região Nordeste com o maior valor (139 casos para cada 100 mil recém-nascidos), correspondendo a 28 vezes o valor encontrado nesta região entre os anos 2000 e 2014 (MARINHO *et al.*, 2016). A associação com a infecção materna pelo vírus Zika foi sugerida e posteriormente confirmada (MARINHO *et al.*, 2016; MINER *et al.*, 2016). Devido a esse surto, a microcefalia tornou-se uma emergência de saúde pública em 2015, entretanto, a mesma deixou de ser em 2017 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b). Um boletim epidemiológico publicado em 2018 pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde relatou que em 2018 foram notificados apenas 396 casos de microcefalia possivelmente relacionados à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas somando os casos em investigação, os confirmados e os prováveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Esse valor representa apenas 31.9% e 12.2% dos casos notificados em 2015 e 2016, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Apesar disso, ainda são necessários estudos para melhor compreender as lacunas existentes relacionadas às síndromes congênitas que causam microcefalia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b).

As crianças com microcefalia associada às síndromes congênitas podem apresentar retardo mental, paralisia cerebral, epilepsia, irritabilidade, transtornos

oculares e persistência de reflexos primitivos (ASHWAL *et al.*, 2009; ARAGAO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2016; SCHULER *et al.*, 2016; VAN DER LINDEN *et al.*, 2016). Além disso, podem apresentar anormalidades cerebrais como malformações corticais severas, lisencefalia, ventriculomegalia, hipoplasia cerebelar e hipodensidade da substância branca (MARTINES *et al.*, 2016; SCHULER *et al.*, 2016; ARAGAO *et al.*, 2016; HAZIN *et al.*, 2016).

2.3 CAUSAS E MODELOS EXPERIMENTAIS DE MICROCEFALIA

Diversos fatores ambientais podem ocasionar a microcefalia, como infecções, desnutrição e agentes teratogênicos (ASHWAL *et al.*, 2009). É importante destacar que cada indutor ocasiona a microcefalia por mecanismos distintos. A redução do tamanho do crânio ocasionada pela desnutrição é um resultado de modificações na concentração de fatores de crescimento, proteínas estruturais e neurotransmissores (WINICK; ROSSO, 1969). Tendo em vista o surto de microcefalia ocasionada pelo Zika vírus (ZIKV), um modelo experimental através da infecção pelo próprio ZIKV durante a gestação foi descrito recentemente (MINER *et al.*, 2016). As evidências apontam que a infecção pelo ZIKV ocasiona microcefalia por atingir células progenitoras neurais (NPC) e células gliais no cérebro em desenvolvimento, resultando em morte celular e redução da proliferação de NPC's (WEN; SONG; MING, 2017).

Além disso, diversos estudos experimentais demonstraram que substâncias farmacológicas utilizadas durante a fase inicial da vida, nos períodos do desenvolvimento dos sistemas fisiológicos, podem levar a mudanças fenotípicas com efeitos permanentes na estrutura e função dos sistemas, como a microcefalia (FURUKAWA *et al.*, 2004; OTSUJI *et al.*, 2005; FURUKAWA *et al.*, 2007). Dentre os indutores farmacológicos da microcefalia, destaca-se o *Acetato de Metilazoximetanol*, um agente antimetabólico que interfere na metilação do ácido nucleico, ocasionando microcefalia com heterotopia cortical, paraventricular e hipocampal, além de alteração nos sistemas de neurotransmissão (JOHNSTON; COYLE, 1982; CHVASSUS-AU-LOUIS *et al.*, 1998), e o *Busulfan*, um agente de alquilação bifuncional utilizado no tratamento da leucemia mielóide crônica e em

regime de condicionamento mieloablativo antes de transplante de células tronco em crianças e adultos (OHIRA *et al.*, 2013).

Em experimentos com roedores, o *Busulfan* apresentou um potencial efeito teratogênico e citotóxico (BISHOP; WASSOM, 1986). Em um estudo com ratos realizado por Furukawa *et al.* (2007), o *Busulfan* ocasionou microcefalia e microftalmia em filhotes de mães expostas à substância em períodos correspondente ao estágio inicial do desenvolvimento do córtex cerebral e estágio do desenvolvimento da lente e da retina. O aumento da apoptose e inibição da mitose do epitélio neural foram destacados como os indutores da hipoplasia do cérebro, retina e lente (FURUKAWA *et al.* 2007). Estudos em modelos experimentais, os quais reproduzem os danos causados pela microcefalia, permitem, dentro dos devidos limites, a extrapolação dos seus resultados para humanos (MINER *et al.*, 2016). Os conhecimentos obtidos com esses modelos podem certamente contribuir para construção de potenciais estratégias terapêuticas, visando minimizar a incapacidade crônica dos indivíduos microcefálicos.

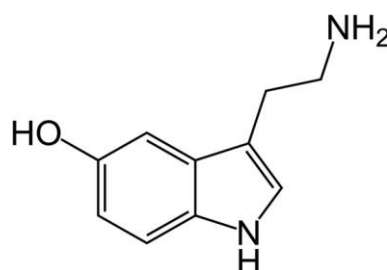
2.4 SISTEMA SEROTONINÉRGICO E MICROCEFALIA

O sistema serotoninérgico é um dos principais sistemas de neurotransmissão envolvido no desenvolvimento das estruturas orofaciais e corticais (BUZNIKOV *et al.*, 1996; VITALIS; PARNAVELAS, 2003). Os neurônios serotoninérgicos fazem parte de um dos sistemas mais amplamente distribuídos no cérebro de mamíferos (SODHI; SANDERS-BUSH, 2004). Esta rede neuronal é também uma das primeiras a desenvolver no embrião (SODHI; SANDERS-BUSH, 2004). Os neurônios serotoninérgicos que se projetam para o prosencéfalo se originam em quatro núcleos do tronco encefálico, sendo os núcleos medianos e dorsais da rafe os principais (KOSOFKY; MOLLIVER, 1987). O núcleo dorsal da rafe projeta finas fibras de serotonina que são mais abundantes no córtex, enquanto o núcleo mediano da rafe fornece fibras de serotonina espessas que são mais abundantes no hipocampo (KOSOFKY; MOLLIVER, 1987).

A serotonina (5-HT) é uma indolamina (Figura 1) formada por um anel indol e uma cadeia lateral carboxil-amida (LAM *et al.*, 2010) que apresenta múltiplas

funções durante o desenvolvimento precoce e a morfogênese craniofacial. Estudos iniciais indicaram que o 5-HT está presente no oócito, onde parece funcionar como um regulador da clivagem celular (BUZNIKOV *et al.*, 1996). Mais tarde, tem um papel significativo durante a gastrulação e neurulação (BURDEN; LAWRENCE, 1973). Durante a morfogênese das estruturas craniofaciais, o 5-HT estimula o desenvolvimento dentário e pode ajudar na formação da cúspide (BUZNIKOV *et al.*, 1996).

Figura 1. Estrutura química da serotonina



Fonte: National Center for Biotechnology Information

Estudos adicionais também destacam a importância da serotonina no desenvolvimento cortical. As evidências apontam para a função regulatória do 5-HT na proliferação, migração, diferenciação neuronal, e prevenção da apoptose celular (VITALIS; PARNAVELAS, 2003). Além disso, a serotonina possui papel importante em atividades que ocorrem no período de lactação, como a sinaptogênese (1º ao 21º dia pós-natal) e neurogênese cortical (até o 15º dia pós-natal) (DAUBERT; CONDRON, 2010; PRESSLER; AUVIN, 2013; SEMPLE *et al.*, 2013). Desta forma, as evidências apoiam a hipótese de que o 5-HT é capaz de facilitar vários aspectos do desenvolvimento cortical, craniofacial e dentário durante os períodos pré e pós-natal.

Análises do sistema serotoninérgico em um modelo experimental de microcefalia induzida pelo Acetato de Metilazoximetanol, um agente de alquilação permitiu a constatação de que este sistema se apresenta prejudicado nesta condição, caracterizado por desenvolvimento anormal das fibras nervosas serotoninérgicas e liberação atrasada de serotonina durante o desenvolvimento do

córtex (FUNAHASHI *et al.*, 1998; UEDA *et al.*, 1999). Assim como o Busulfan, o Acetato de Metilazoximetanol ocasiona a microcefalia por redução das células mitoticamente ativas (NAGATA; MATSUMOTO, 1969). Sendo assim, os resultados sugerem alterações morfológicas e funcionais das fibras serotoninérgicas em animais submetidos a um modelo experimental de microcefalia.

Entretanto, apesar da literatura sugerir que a microcefalia pode cursar com deficiências no sistema serotoninérgico, nenhuma manipulação deste sistema, durante o período crítico do desenvolvimento, foi realizada em animais submetidos a um modelo experimental de microcefalia, visando seus efeitos sobre o desenvolvimento somático e neuromotor.

2.5 TRIPTOFANO E PRODUÇÃO DA SEROTONINA

O triptofano é um aminoácido essencial presente em alimentos como aveia, banana, kiwi, ameixa seca, leite, atum, queijo, pão, frango, peru, ovos, nozes, amendoim e chocolate (FUKUWATARI; SHIBATA, 2013). No sangue, 75-95% do triptofano circula conjugado à albumina, assim, álcool, drogas, desnutrição proteica e outros fatores que causem hipoalbuminemia podem ocasionar diminuição da biodisponibilidade do triptofano (KESZTHELYI *et al.*, 2009; STAVRUM *et al.*, 2013; PALEGO *et al.*, 2016). Este aminoácido é precursor da serotonina e quirunenina, além de participar da síntese proteica (FUKUWATARI; SHIBATA, 2013).

Aproximadamente 95% da serotonina é encontrada no trato gastrointestinal, desta forma, a maioria do triptofano ingerido é direcionado para as células enterocromafins para a produção do neurotransmissor no intestino, onde atua regulando a secreção, o esvaziamento e o peristaltismo (JONNAKUTY; GRAGNOLI, 2008). Parte do triptofano não direcionado para as células intestinais chega à barreira hematoencefálica, onde compete com aminoácidos neutros (histidina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, treonina, tirosina e valina) pelo transporte para o sistema nervoso central (SNC) (KESZTHELYI *et al.*, 2009; STAVRUM *et al.*, 2013; PALEGO *et al.*, 2016). Estudos relataram que após a secreção de insulina, a disponibilidade do triptofano é aumentada através da diminuição da competição com estes aminoácidos. Assim, a ingestão de triptofano com carboidratos é uma

estratégia útil para aumentar a disponibilidade do mesmo para o SNC (RICHARD *et al.*, 2009; LE FLOC'H *et al.*, 2011). Por outro lado, estresse, resistência à insulina, deficiência de magnésio e vitamina B6 influenciam negativamente a produção de serotonina, entretanto, a razão triptofano/aminoácidos competidores e a disponibilidade de triptofano são os principais fatores que podem afetar o processo (RICHARD *et al.*, 2009; LE FLOC'H *et al.*, 2011).

No SNC, o triptofano produz, nos neurônios serotoninérgicos, a serotonina, a qual é estocada nos grânulos secretórios dos neurônios (JONNAKUTY; GRAGNOLI, 2008). A serotonina participa no controle de comportamentos como humor, percepção, memória, medo, raiva, apetite, além de atuar no controle motor, na regulação cerebelar, nos ritmos circadianos, na temperatura corporal e na sinalização para o desenvolvimento neurológico (BERGER *et al.*, 2009). Além disso, a serotonina é um importante regulador do oscilador biológico localizado no núcleo supraquiasmático (GLASS *et al.*, 2000). Este oscilador é sincronizado pelas pistas luminosas e é responsável por regular nossos ritmos biológicos (CARD; MOORE, 1989). Estudos com roedores relataram que síntese e liberação de serotonina estão sujeitas a variações circadianas, sendo o nível máximo de liberação obtido durante o início do ciclo escuro (BARASSIN *et al.*, 2002; DUDLEY *et al.*, 1998). Segundo Barassin *et al.* (2002), a triptofano hidroxilase produzida durante o dia é transportada para a terminação nervosa para sintetizar a serotonina no início do ciclo escuro (BARASSIN *et al.*, 2002). Mateos *et al.* (2009), após a administração oral de triptofano (125mg/kg) 1 hora antes do ciclo escuro, mediram os níveis de serotonina por 24h e relataram que os níveis atingiram o pico 2 horas após a administração (MATEOS *et al.*, 2009). Assim, o horário de ingestão do triptofano também pode influenciar a síntese de serotonina.

A síntese de 5-HT a partir do triptofano envolve diversas etapas (Figura 2). Inicialmente o L-TRI é hidroxilado e convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela ação da triptofano hidroxilase, que utiliza como cofatores o oxigênio e a tetrahidrobiopterina (KESZTHELYI *et al.*, 2009; STAVRUM *et al.*, 2013; PALEGO *et al.*, 2016). Em seguida, o 5-HTP é descarboxilado, a partir da enzima descarboxilase dos L-aminoácidos aromáticos, que utiliza como cofatores piridoxal 5-fosfato,

magnésio e vitamina B3, dando origem a 5-HT (KESZTHELYI *et al.*, 2009; STAVRUM *et al.*, 2013; PALEGO *et al.*, 2016) (Figura 2).

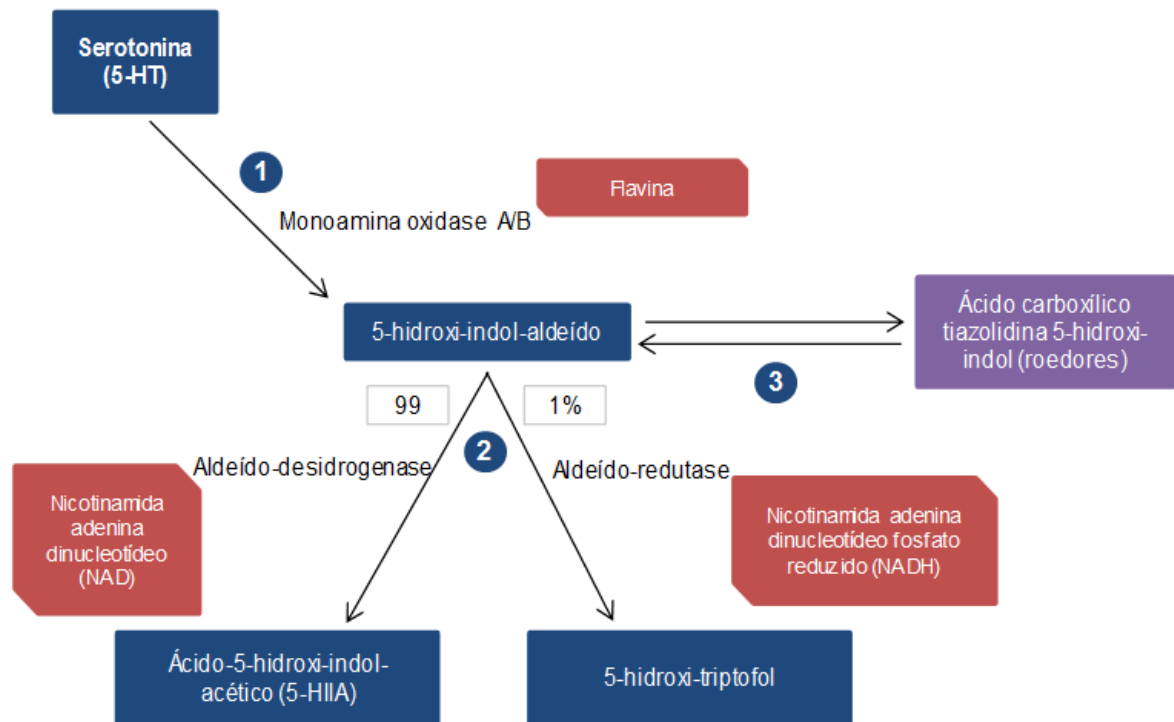
Figura 2. Síntese da serotonina a partir do triptofano.



Fonte: Elaborada pelo autor baseada em informações de Keszthelyi *et al.* (2009), Stavrum *et al.* (2013) e Palego *et al.* (2016).

A degradação da 5-HT é feita primeiramente pela enzima monoamina oxidase (MAO), que utiliza a flavina como cofator, originando o 5-hidroxi-indol-aldeído (5-HIAL) (KESZTHELYI *et al.*, 2009). Em seguida, o 5-HIAL é degradado pela aldeído desidrogenase (~99%), que utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) como cofator, tendo como produto final o ácido 5- hidroxindolacético (5-HIAA) (KESZTHELYI *et al.*, 2009). O 5-HIAL também pode ser degradado pela aldeído redutase (~1%), que utiliza a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADH) como cofator, produzindo o 5-hidroxi-triptofol (5-HTOL) (KESZTHELYI *et al.*, 2009) (Figura 3). Em roedores, o 5-hidroxi-indol-aldeído pode originar o ácido carboxílico tiazolidina 5-hidroxi-indol (5-HITCA) quando condensado com a L-cisteína (SQUIRES *et al.*, 2006) (Figura 3).

Figura 3. Degradação da serotonina em humanos e roedores.



Fonte: Elaborada pelo autor baseada em informações de Keszthelyi *et al.* (2009) e Squires *et al.* (2006).

2.6 MANIPULAÇÃO DIETÉTICA E FARMACOLÓGICA DE TRIPTOFANO/SEROTONINA

Estudos concluíram que a administração de triptofano ocasiona aumento do triptofano no cérebro, assim como de serotonina (FERNSTROM; WURTMAN, 1972; HALEEM *et al.*, 1998; TRULSON; JACOBS, 1976). Trulson e Jacobs (1976) relataram que os níveis de serotonina são elevados em 0-15% e 60-90% com doses de 10 e 100 mg/kg, respectivamente (TRULSON; JACOBS, 1976). Desta forma, sugere-se que a utilização desse aminoácido pode facilitar a neurotransmissão serotoninérgica e ser útil no tratamento de várias doenças cerebrais que cursam com deficiência de serotonina (HALEEM, 2017).

Utilizando um modelo de paralisia cerebral induzida por Lipopolissacarídeo (LPS), Del Angel-Meza *et al.* (2011) Relataram que o triptofano apresentou atividade neuroprotetora contra danos oxidativos ocasionado pelo modelo (DEL ANGEL-MEZA *et al.*, 2011). Friedman *et al.* (2012), ao oferecerem tratamento por via oral

com L-dopa com e sem associação ao 5-hidroxitriptofano (5-HTP) para portadores de paralisia cerebral, observaram uma melhor eficácia na redução dos sintomas de distonia, ataxia e fraqueza muscular nos pacientes que receberam 5-HTP (FRIEDMAN *et al.*, 2012). Haleem *et al.* (1998) relataram que a injeção do aminoácido triptofano em doses de 50 mg/kg não produziu nenhum efeito sobre a ingestão de alimentos em animais não estressados, entretanto, inibiu o estresse induzido pela anorexia nervosa (HALEEM *et al.*, 1998). Em um estudo experimental com manipulação dietética aguda de triptofano, Zhang *et al.* (2015) concluíram que alterações nos níveis de 5-HT ocasionaram modificações no comportamento social, no conteúdo de serotonina cerebral e de corticosterona no sangue (Zhang *et al.*, 2015). Os resultados desses estudos sugerem que a suplementação de triptofano pode ser útil no tratamento de doenças que apresentam diminuição de serotonina, enquanto que a deficiência nutricional de triptofano pode precipitar sintomas associados à deficiência deste neurotransmissor.

Entretanto, as evidências indicam que a utilização de doses maiores de triptofano (70-200mg/kg via oral ou intravenosa) podem estar relacionadas com efeitos negativos como tremor, náusea e tonturas (FERNSTROM *et al.*, 2012). Estes efeitos são observados quando o triptofano é administrado sozinho ou com drogas que aumentam a função da serotonina, como os antidepressivos (VOLPI-ABADIE; KAYE; KAYE, 2013). Em alguns casos, a síndrome da serotonina é diagnosticada, principalmente quando o triptofano é administrado junto com as drogas (FERNSTROM *et al.*, 2012). A síndrome da serotonina é uma condição ocasionada pelo excesso de atividade da serotonina nos receptores periféricos e centrais, geralmente ocasionada por medicamentos antidepressivos como os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (STERNBACH, 1991; MARTIN, 1996; VOLPI-ABADIE; KAYE; KAYE, 2013). Os sintomas da síndrome da serotonina incluem agitação, delírio, coma, midríase, sudorese, hipertermia, tremor, rigidez e mioclonia (STERNBACH, 1991; MARTIN, 1996).

Recente revisão realizada por Visco *et al.* (2018) relatou que o uso de antidepressivos pode estar relacionado com prejuízos na musculatura esquelética, como na sua estrutura e no metabolismo, por exemplo (VISCO *et al.*, 2018). Estudos experimentais com inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS) no

período de lactação (dia 1 ao 21 pós-natal) demonstraram retardo na maturação e/ou crescimento somático (DEIRÓ *et al.*, 2004; DEIRÓ *et al.*, 2006), na ontogênese de reflexos (DEIRÓ *et al.*, 2006; DEIRÓ *et al.*, 2008), no desenvolvimento dos neurônios serotoninérgicos (SILVA *et al.*, 2010), no desenvolvimento anatômico crânio-encefálico (MAGALHÃES *et al.*, 2006) e na atividade locomotora (RIBAS *et al.*, 2008). Assim, os resultados sugerem que a utilização de fármacos que visam o aumento da atividade da serotonina pode ocasionar danos, associados possivelmente com a síndrome da serotonina.

Embora o papel da serotonina no desenvolvimento precoce e morfogênese craniofacial seja bem definido, nenhum estudo testou se a suplementação de triptofano, visando o aumento da síntese serotoninérgica num período crucial no desenvolvimento do sistema nervoso central, pode ser útil na redução ou reversão das sequelas cranioencefálicas presentes na microcefalia. Contudo, a manipulação deste sistema de neurotransmissão deve ser realizada mediante cuidados, dentro de alguns limites. Isto se deve ao fato de que a exacerbação do sistema serotoninérgico leva ao quadro da síndrome da serotonina, evidenciado em estudos que fizeram uso de doses de triptofano variando entre 70 a 200mg/kg e com o uso de ISRS. Além disso, o uso dos ISRSs promoveu prejuízos sobre a ontogênese de reflexos e desenvolvimento crânio-encefálico, quando administrados durante a lactação. Entretanto, não podemos olvidar do potencial efeito benéfico do aumento dos níveis encefálicos da serotonina, com importantes funções durante um período crítico do desenvolvimento, sobre a maturação somática e neural. Assim, sugere-se que a oferta de uma dose de triptofano menor, como a de 10mg/kg, incapaz de induzir a síndrome serotoninérgica, mas capaz de aumentar os níveis de serotonina em 0-15%, possa ter efeitos benéficos com relação ao desenvolvimento cranioencefálico quando administrada num período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso central.

3 HIPÓTESE

O tratamento neonatal com baixa dose de triptofano reverte o atraso na maturação dos reflexos e das características somáticas e favorece o desenvolvimento das estruturas craniofaciais e encefálicas em ratos submetidos a um modelo experimental de microcefalia.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

Estudar o efeito do tratamento neonatal com baixa dose de L-triptofano sobre o desenvolvimento craniofacial, somático e encefálico em ratos submetidos a um modelo experimental de microcefalia.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Analisar, em ratos submetidos a um modelo experimental de microcefalia:

- Os indicadores murinométricos do desenvolvimento durante os primeiros 21 dias pós-natais;
- Desenvolvimento das características somáticas e ontogênese de reflexos durante os primeiros 21 dias pós-natais;
- Os parâmetros de desenvolvimento craniofacial no 28º dia pós-natal;
- Parâmetros morfométricos do córtex cerebral no 28º dia pós-natal.

5 MÉTODOS

5.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB), localizado no Departamento de Nutrição do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, em Recife.

5.2 ANIMAIS

Foram utilizados filhotes (machos e fêmeas, n=230) de ratos da linhagem Wistar (espécie *Rattus Novergicus Albinus*), obtidos através de 24 ratas Wistar adultas, além de 10 ratos Wistar adultos para o acasalamento na proporção de 2:1 (2 fêmeas:1 macho), provenientes do biotério do Departamento de Nutrição da UFPE.

A escolha das progenitoras obedeceu aos seguintes critérios de inclusão: ratas entre 90 e 120 dias de vida, não parentes, primíparas, com peso entre 220g e 250g, para evitar quaisquer influências genéticas e/ou fisiológicas nos filhotes gerados. O critério de inclusão para os machos utilizados no acasalamento foi: idade acima de 90 dias. Foi realizado o acompanhamento do ciclo estral das ratas progenitoras, a fim de identificar seu período fértil para acasalamento, através da técnica de esfregaço vaginal.

Os animais foram mantidos a temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas (início do ciclo escuro às 8:00h) e livre acesso à água e ração (Presença ratos e camundongos - Presença Nutrição Animal). O protocolo de manipulação e bem-estar dos animais seguiu as orientações da Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica (DBCA), lançada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, processo nº 0003/2017 (Anexo A).

5.3 DELIMITAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após a confirmação da gestação, foram formados aleatoriamente três grupos de gestantes, com base na indução farmacológica de microcefalia:

- 1- Controle (A, n=8 ninhadas).
- 2- Azeite (B, n=8 ninhadas).
- 3- Busulfan (C, n=8 ninhadas).

O grupo Busulfan recebeu o medicamento *Busulfan* diluído em óleo de oliva por via intraperitoneal (Sigma, 10 mg/kg; 0,5 mL/100 g de peso corporal), o grupo Azeite recebeu apenas óleo de oliva (controle da droga), administrado por via intraperitoneal (0,5 mL/100 g de peso corporal) e o grupo Controle recebeu apenas salina (controle do veículo), administrado por via intraperitoneal (0,5 mL/100g de peso corporal). As ratas foram tratadas diariamente do 12º ao 14º dia gestacional, fase inicial de desenvolvimento do córtex cerebral (DESESSO, 2005). A dose de 10 mg/kg i.p. foi previamente relatada como sendo efetiva para induzir microcefalia por Furukawa *et al.* 2007.

Após o nascimento, os filhotes de cada ninhada (Controle, Azeite e Busulfan, , 8-12 animais por ninhada) foram mantidos com suas respectivas mães e subdivididos em dois grupos submetidos até o 21º dia pós-natal à dose diária (via subcutânea) de:

- 1- Salina, recebendo 10mL/kg de solução salina de NaCl a 0,9% (10mL/kg, 10µl/g);
- 2- Triptofano, 10mg/kg de L-triptofano diluído em solução salina de NaCl a 0,9% (NaCl 0.9%, 10µl/g).

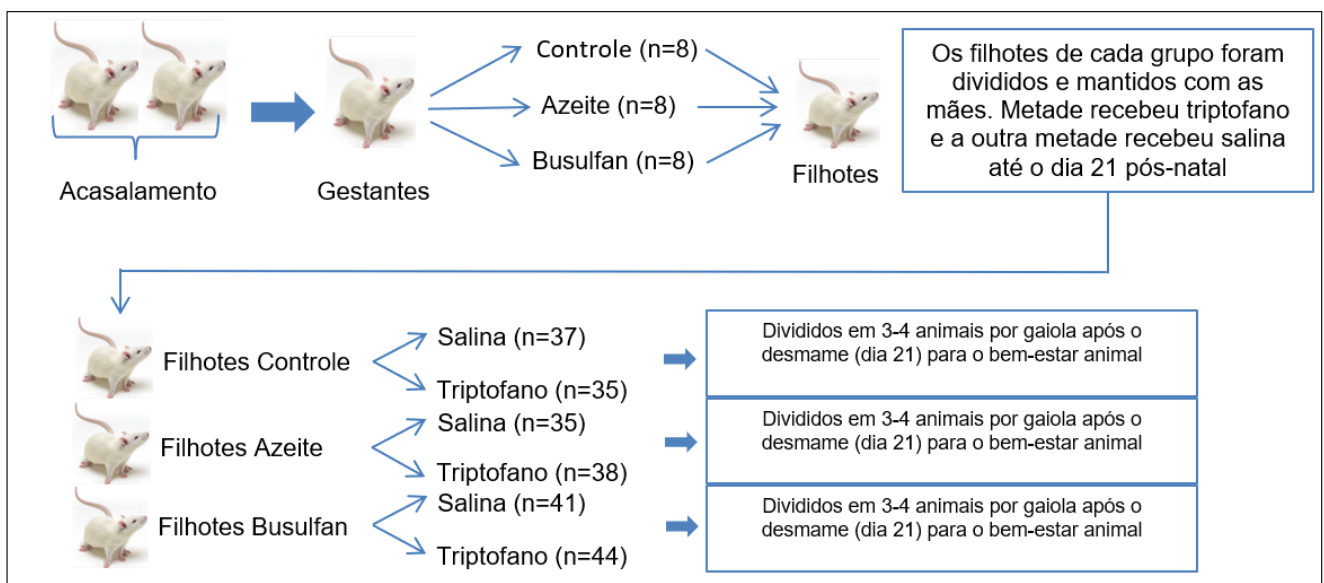
A concentração de triptofano utilizada neste estudo (10mg/kg) foi determinada em estudo prévio de relação dose efeito (TRULSON; JACOBS, 1976). No 22º dia, os

animais foram desmamados e separados em gaiolas (3-4 animais por gaiola), constituindo grupos:

- 1- Controle salina (n=37 animais);
- 2- Azeite salina (n=35 animais);
- 3- Busulfan salina (n=41 animais);
- 4- Controle triptofano (n=35 animais);
- 5- Azeite triptofano (n=38 animais);
- 6- Busulfan triptofano (n=44 animais).

A figura 4 resume o delineamento experimental que foi realizado para a obtenção dos 6 grupos experimentais.

Figura 4. Delineamento experimental



Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir do desmame, os animais foram mantidos até o dia 28 pós-natal. No dia 28, alguns animais foram eutanasiados por decapitação para posterior análise anatômica do crânio e mandíbula, enquanto outros foram eutanasiados por perfusão transcardíaca para análise histológica do encéfalo e suas partes, tendo em vista que não é possível fazer as duas análises no mesmo animal.

5.4 ANÁLISES EXPERIMENTAIS

5.4.1 Avaliações *in vivo*

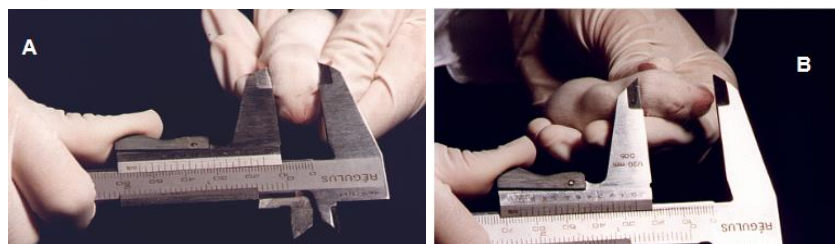
As avaliações *in vivo* foram realizadas diariamente, em cada animal, durante os primeiros 21 dias pós-natais com o auxílio de um paquímetro digital, uma balança digital (Marte, modelo S-1000, capacidade de 1 Kg e sensibilidade de 0,1g) e utensílios necessários para a avaliação das características somáticas (cotonete) e ontogênese de reflexos (objeto cilíndrico de metal fino, rampa 45° com papel antiderrapante, pote de plástico preenchido com algodão e régua).

Os animais de todos os grupos foram avaliados diariamente entre 08:00-12:00h (ciclo invertido). Após a retirada dos animais da gaiola para a avaliação dos indicadores murinométricos, da maturação das características somáticas e ontogênese de reflexos, os mesmos não passaram mais do que 40-60 minutos longe dos cuidados maternos.

5.4.2 Estudo dos indicadores murinométricos do desenvolvimento

As medidas realizadas foram as distâncias (mm) entre o focinho e a protuberância occipital externa do crânio (Eixo ântero-posterior do crânio -EAPC), entre os orifícios das orelhas (Eixo látero-lateral do crânio -ELLC), como descrito por Barros (1999) (Figura 5). O peso corporal foi avaliado diariamente para o cálculo individual da dose de triptofano.

Figura 5 – Eixo látero-lateral (A) e Eixo ântero-posterior (B).



Fonte: Barros, 1999.

5.4.3 Diagnóstico do dano encefálico (microcefalia)

Os animais foram classificados como microcefálicos quando apresentaram redução de pelo menos um dos dois eixos do crânio avaliados (EAPC e ELLC). Os pontos de corte (média menos o desvio-padrão do grupo C no primeiro dia de vida) foram 15,10 mm e 10,28 mm para os eixos EAPC e ELLC, respectivamente.

5.4.4 Desenvolvimento das características somáticas

As características somáticas foram avaliadas diariamente, desde o nascimento (P1) até a o dia onde houve a maturação de cada característica. Foram avaliados: o dia pós-natal de abertura dos olhos (AO), bem como o dia em que os incisivos superiores (EIS) e os incisivos inferiores (EII) romperam a gengiva e foram expostos (Smart; Dobbing, 1971).

5.4.5 Avaliação da ontogênese de reflexos

As respostas reflexas foram avaliadas conforme descrito por Smart e Dobbing (1971) e Fox (1965). As respostas foram avaliadas diariamente até a maturação. O primeiro de uma série de três dias consecutivos em que a resposta esperada apareceu completamente foi considerado o dia da maturação do reflexo. As respostas observadas que indicavam a maturação dos reflexos foram:

- Reflexo preensão palmar (PP) - Flexão rápida dos dedos após duas leves percussões na palma da pata dianteira;
- Reflexo de recuperação de decúbito (RD) - Giro do corpo em decúbito dorsal para decúbito ventral em até 10 segundos;
- Reflexo de colocação pelas vibrissas (CV) - Reflexo de colocar as patas anteriores sobre a mesa, tentando caminhar quando suspenso pela cauda em até 10 segundos;

- Reflexo de aversão ao precipício (AP) - Deslocamento angular de 45° do animal em até 10 segundos, quando o animal é colocado com as patas dianteiras sobre a margem de uma superfície plana e alta (precipício);
- Reflexo de resposta ao susto (RS) - Simultânea e rápida retração com a imobilização involuntária do corpo do animal após estampido agudo;
- Reflexo de queda livre (QL) - Giro do animal em queda livre de 30 cm de altura, quando segurado pelas quatro patas em decúbito dorsal, apoiando-se sobre as quatro patas em um leito de algodão;
- Reflexo de geotaxia negativa (GN) - No centro de uma rampa de 45° de inclinação, o animal com a cabeça no sentido descendente gira em até 10 segundos e posiciona a cabeça em sentido ascendente;
- Reflexo de Bar holding (BH) - O animal, sobre uma régua com 10 cm de distância da superfície, segura e se mantém na régua sem cair por até 10 segundos.

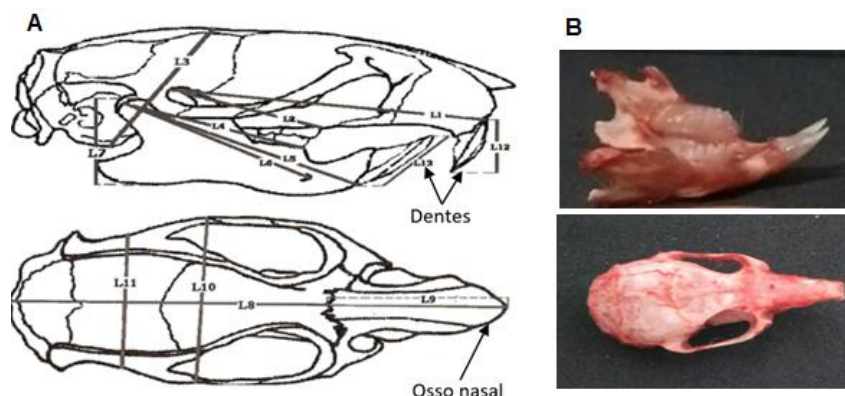
5.4.6 Medidas dos parâmetros craniofaciais

Aos 28 dias de idade, as cabeças dos ratos foram cuidadosamente coletadas. Em seguida houve remoção do tecido orgânico para que as medidas fossem realizadas. Os seguintes parâmetros foram avaliados nos crânios, mandíbulas e dentes usando um paquímetro com acurácia de 0,01 mm (Figura 6) (KARA *et al.*, 2009; SEYEDMAJIDI *et al.*, 2014):

- L1: Borda anterior da fossa glenoide - extensão anterior extrema do osso maxilar entre os incisivos;
- L2: Borda anterior da fossa glenoide - junção da superfície mesial do primeiro molar com um osso alveolar;
- L3: Comprimento máximo do crânio: A intersecção da sutura fronto-parietal e a sutura interparietal no plano sagital médio - ponto mais inferior do processo timpânico;
- L4: Borda posterior do côndilo - junção da superfície mesial do primeiro molar com o osso alveolar;

- L5: Borda posterior do côndilo - extensão mais anterior do osso maxilar entre os incisivos;
- L6: Borda posterior do côndilo - margem posterior do forame mental;
- L7: Superfície mais superior do côndilo - linha tangente à borda inferior da mandíbula;
- L8: Comprimento total crânio: ponto mais anterior da sutura internasal no plano sagital médio - ponto mais posterior e externo da escama occipital;
- L9: Comprimento nasal: ponto mais anterior da sutura internasal no plano sagital médio - intersecção da sutura nasofrontal e a sutura internasal no plano sagital médio;
- L10: Largura Interzigomático: distância medida entre os pontos zigomáticos esquerdo e direito (ponto mais externo da sutura temporozigomática no arco zigomático);
- L11: Largura máxima do crânio: distância medida entre os pontos temporais direito e esquerdo (ponto mais distante da escama temporal do plano sagital médio);
- L12: Comprimento dos dentes anteriores da maxila: distância entre as bordas incisivas do dente anterior e da margem da gengiva;
- L13: Comprimento dos dentes anteriores da mandíbula: distância entre as bordas incisivas do dente anterior e a margem da gengiva.

Figura 6 – **A.** Medidas nos planos transversal e sagital. **B.** Imagens representativas do crânio e mandíbula nos planos transversal e sagital.



Fonte: **A.** Adaptado de Kara *et al.*, 2009. **B.** Imagens obtidas pelo autor.

5.4.7 Análise morfométrica do córtex cerebral

Aos 28 dias de idade, partes dos animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (50 mg/kg, ip) e submetidos a perfusão transcardíaca imediata com solução salina tamponada fosfatada seguida de solução fixadora (4% de paraformaldeído em PBS 0,1 M, pH 7,4 a 4°C). Após perfusão, os encéfalos foram retirados do crânio e pós-fixados na mesma solução fixadora a 4°C durante uma noite. Em seguida foram desidratados em solução crioprotetora (30 % de sacarose em PBS 0.1 M) também a 4°C durante o tempo necessário para que se depositem no fundo do recipiente. Posteriormente, foram armazenados em freezer -80 °C (graus Celsius).

Foram realizados cortes seriados do cérebro de cada animal (20 µm de espessura) em direção à região occipital. Os cortes foram submetidos à coloração pela cresil-violeta e foram visualizados ao microscópio óptico. Foram realizados estudos morfométricos por microscopia óptica no córtex somatossensorial (S1) correspondente à área dos membros inferiores, identificado através de coordenadas estereotáticas (-2.28 a 0.36 mm de bregma) (PAXINOS; WATSON, 1986). As imagens da área especificada foram fotografadas com aumento de 40x (para contagem de células na camada V), usando uma câmera digital adaptada a um microscópio óptico (OLYMPUS modelo U-CMAD-2) e a um sistema digital de análise de imagens. Para cada rato, neurônios foram contados por unidade de área (1365.84 µm²) manualmente em 10 campos em cada corte (cinco no hemisfério esquerdo e cinco no direito) (MARCUIZZO *et al.*, 2010). Os neurônios foram identificados pela presença de um citoplasma corado com e pelo seu tamanho (geralmente maior que as células da glia e com formato não esférico) (MARCUIZZO *et al.*, 2010). As células da glia geralmente são menores do que os neurônios e possuem aspecto esférico (MARCUIZZO *et al.*, 2010; SELEMON *et al.*, 1999). Somente os neurônios piramidais característicos (com os nucléolos claramente visíveis) foram contados.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Cada ninhada foi considerada como sendo uma unidade amostral e as análises estatísticas foram realizadas utilizando os valores da média de cada ninhada. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e posteriormente foram utilizados os testes adequados para avaliar diferenças significativas. As medidas murinométricas, medidas craniofaciais e peso corporal foram expressos como média \pm erro padrão da média. As características somáticas e ontogênese de reflexos foram expressas como mediana (mínimo-máximo). O teste ANOVA two-way medidas repetidas junto com o teste post-hoc de Bonferroni foi realizado para avaliar diferenças significativas nas medidas murinométricas e peso corporal. O teste ANOVA two-way múltiplas comparações junto com o teste post-hoc de Tukey's foi realizado para avaliar diferenças significativas nas características somáticas, ontogênese de reflexos (RD, CV, AP, RS, QL e BH), medidas craniofaciais e análise morfométrica do córtex. O teste de Kruskal-Wallis junto com o teste de múltiplas comparações de Dunn's foi realizado para os reflexos PP e GN. O nível de significância utilizado foi de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram analisados no GraphPadPrism 7.0 SigmaStat 3.5.

6 RESULTADOS

Durante o período de lactação (P1 ao P21), os animais de cada grupo foram analisados em termos de desenvolvimento das características somáticas, incluindo análise da evolução dos eixos ântero-posterior e látero-lateral do crânio, peso corporal, desenvolvimento das características somáticas e ontogênese de reflexos.

Os ratos pertencentes ao grupo Busulfan apresentaram redução significativa do eixo látero-lateral do crânio em todo período de lactação e do eixo ântero-posterior a partir do dia 5, quando comparado com os grupos Azeite e Controle (Figura 7 A e B). No primeiro dia, utilizando o ponto de corte descrito anteriormente, todos os animais do grupo Busulfan foram classificados como microcefálicos, pois apresentaram valores abaixo de 15,10 mm para EAPC e/ou 10,28 mm para ELLC. Os animais que receberam triptofano não apresentaram diferença quando comparado com os receberam salina (Figura 7).

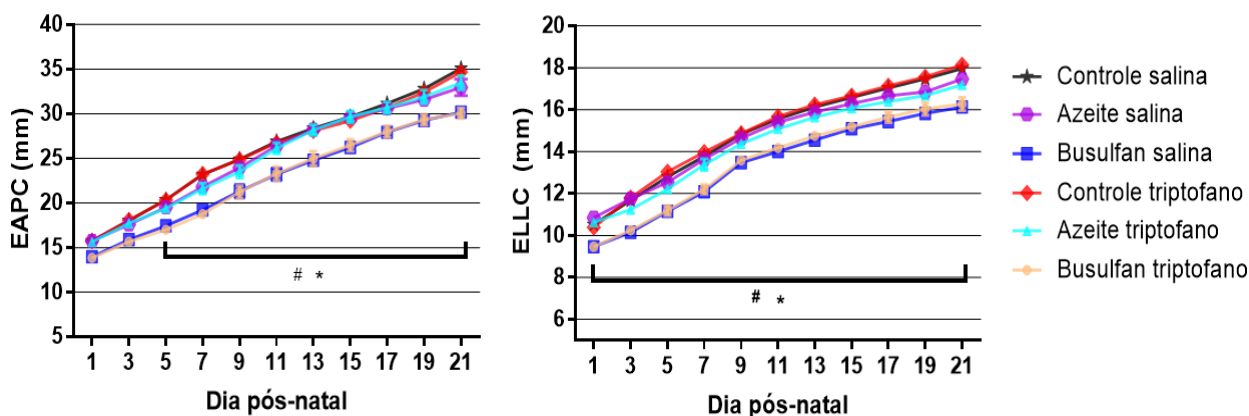


Figura 7. Efeito da intervenção com triptofano sobre a evolução dos eixos cranianos no período de lactação: **(A)** Eixo ântero-posterior do crânio (EAPC) e **(B)** Látero-lateral do crânio (ELLC) no período de lactação. As avaliações foram realizadas a cada 2 dias. Controle salina (n=35); Azeite salina (n=44); Busulfan salina (n=38); Controle triptofano (n=37); Azeite triptofano (n=41); Busulfan triptofano (n=35). #Busulfan salina vs Azeite salina e Controle salina. *Busulfan triptofano vs Azeite triptofano e Controle triptofano. Valores representam média \pm erro padrão da média. ANOVA two-way medidas repetidas e teste post-hoc de Bonferroni, $p < 0.05$.

No que concerne à evolução do peso corporal no período de lactação, os filhotes do grupo Busulfan apresentaram redução significativa apenas nos dias 19 e

21, quando comparado com os grupos Azeite e Controle (Dia 19 – Controle Salina: $34,75 \pm 3,51$ g, Azeite Salina: $31,27 \pm 3,73$ g vs Busulfan Salina: $26,59 \pm 5,26$ g, Controle Triptofano: $34,88 \pm 4,33$ g, Azeite Triptofano: $32,06 \pm 4,71$ g vs Busulfan Triptofano: $26,51 \pm 5,43$ g, $p < 0.05$; Dia 21 – Controle Salina: $39,52 \pm 3,93$ g, Azeite Salina: $36,63 \pm 4,50$ g vs Busulfan Salina: $29,60 \pm 5,8$ g, Controle Triptofano: $40,09 \pm 5,53$ g, Azeite Triptofano: $37,04 \pm 5,32$ g vs Busulfan Triptofano: $29,47 \pm 6,14$ g, $p < 0.05$) (Figura 8). Não houve diferença entre os animais que receberam triptofano e salina (Figura 8).

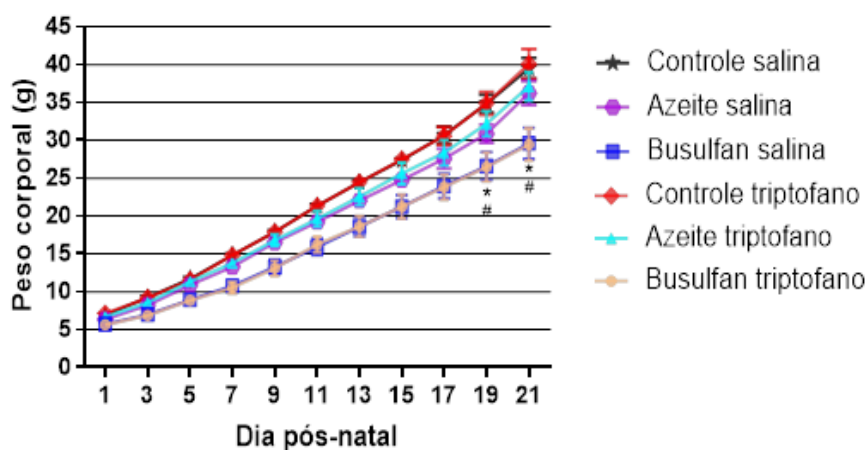


Figura 8. Efeito da intervenção com triptofano sobre a evolução do peso corporal no período de lactação. O peso corporal foi avaliado diariamente. Controle salina (n=35); Azeite salina (n=44); Busulfan salina (n=38); Controle triptofano (n=37); Azeite triptofano (n=41); Busulfan triptofano (n=35). #Busulfan salina vs Azeite salina e Controle salina. *Busulfan triptofano vs Azeite triptofano e Controle triptofano. Valores representam média \pm erro padrão da média. ANOVA two-way medidas repetidas e teste post-hoc de Bonferroni, $p < 0.05$.

Com relação à maturação dos reflexos e das características somáticas, os animais do grupo Busulfan apresentaram retardo no desaparecimento do reflexo de preensão palmar, quando comparado com os animais do grupo Azeite e Controle. Além disso, apresentaram retardo no aparecimento dos reflexos de recuperação de decúbito, colocação pelas vibrissas e queda livre, quando comparado com os animais do grupo Azeite e Controle (Tabela 1). No que diz respeito às características somáticas, os animais do grupo Busulfan apresentaram retardo na erupção dos incisivos superiores e inferiores quando comparado com os animais do grupo Azeite

e Controle (Tabela 1). Não houve diferença entre os animais que receberam triptofano e salina (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da intervenção com triptofano na ontogênese de reflexos e características somáticas nos diferentes grupos.

	Grupo					
	CS	AS	BS	CT	AT	BT
Reflexos						
Aversão ao precipício	6 (4-8)	6 (3-9)	6 (4-9)	5,5 (3-8)	6 (3-9)	7 (5-8)
Bar holding	14 (12-17)	14 (13-17)	15 (12-17)	14 (12-16)	13 (12-17)	14 (11-16)
Colocação pelas vibrissas	5 (3-7)	5 (4-8)	8 (5-11) ^a	5 (3-6)	6 (4-8)	9 (7-12) ^b
Geotaxia negativa	13 (11-16)	14 (13-16)	16 (14-19)	13 (12-16)	14 (13-17)	16 (14-18)
Queda livre	14 (12-16)	14 (12-17)	17 (16-18) ^a	14 (12-16)	14 (13-16)	17 (15-18) ^b
Preensão palmar	4 (3-6)	5 (4-6)	8 (3-8) ^a	5 (3-5)	5 (3-6)	8 (4-8) ^b
Recuperação de decúbito	4 (2-5)	3 (2-6)	6 (4-7) ^a	4 (3-5)	4 (2-6)	6 (4-8) ^b
Resposta ao susto	13 (11-14)	13 (10-15)	13 (10-16)	13 (10-14)	13 (11-14)	13 (11-16)
Características						
Erupção dos incisivos superiores	8 (7-10)	8 (7-10)	10 (8-12) ^a	7 (7-9)	8 (7-9)	10 (8-12) ^b
Erupção dos incisivos inferiores	5 (4-8)	6 (5-8)	8 (7-10) ^a	5 (4-7)	6 (5-7)	8 (7-9) ^b
Abertura ocular	14 (13-17)	14 (13-16)	15 (14-18)	14 (13-16)	14 (13-15)	15 (13-17)

Valores representam mediana (mínimo-máximo). CS, Controle salina (n=20). AS, Azeite salina (n=15). BS, Busulfan Salina (n=16). CT, Controle triptofano (n=19). AT, Azeite triptofano (n=14). BT, Busulfan triptofano (n=15). ^aBusulfan salina vs Azeite salina e Controle salina. ^bBusulfan triptofano vs Azeite triptofano e Controle triptofano. ANOVA two-way múltiplas comparações e teste post-hoc de Tukey's. Kruskal-Wallis e teste de múltiplas comparações de Dunn's (PP e GN). $p < 0.05$.

Com relação às medidas craniofaciais, observou-se redução significativa nas medidas L1, L2, L3, L5, L6 e L9 dos animais do grupo Busulfan quando comparado com os animais do grupo Azeite e Controle (Tabela 2). Além disso, houve diferença significativa na medida L9 quando comparado os grupos Azeite Triptofano vs Controle Triptofano (Tabela 2). Não houve diferença entre os animais que receberam triptofano e salina (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito da intervenção com triptofano nas medidas craniofaciais no 28º dia de vida nos diferentes grupos.

Medida	Grupo					
	CS	AS	BS	CT	AT	BT
L1	25,01 ± 0,39	24,89 ± 0,63	20,69 ± 0,99 ^a	24,91 ± 0,55	25,07 ± 0,29	20,53 ± 1,04 ^c
L2	13,30 ± 1,91	12,36 ± 2,13	10,01 ± 0,39 ^a	13,40 ± 1,77	12,69 ± 2,05	9,76 ± 0,50 ^c
L3	12,85 ± 0,71	13,24 ± 2,21	9,86 ± 0,22 ^a	13,03 ± 0,51	13,06 ± 2,25	9,93 ± 0,15 ^c
L4	15,66 ± 0,19	15,80 ± 1,82	13,58 ± 0,52 ^a	15,48 ± 0,25	15,60 ± 1,46	13,56 ± 0,63 ^c
L5	22,06 ± 1,32	20,99 ± 0,42	16,70 ± 2,21 ^a	22,25 ± 0,67	20,96 ± 1,02	16,72 ± 2,46 ^c
L6	16,23 ± 0,25	16,36 ± 1,33	13,95 ± 1,63 ^a	16,01 ± 0,23	16,23 ± 1,09	13,82 ± 1,79 ^c
L7	16,26 ± 0,56	16,19 ± 1,17	14,20 ± 0,53	16,59 ± 0,26	15,96 ± 0,96	14,12 ± 0,44
L8	25,01 ± 0,46	23,62 ± 0,76	22,47 ± 0,47	25,19 ± 0,28	23,55 ± 0,93	22,49 ± 0,52
L9	15,58 ± 0,66	14,11 ± 0,53	11,51 ± 2,18 ^a	15,44 ± 0,82	13,77 ± 0,80 ^b	11,46 ± 2,24 ^c
L10	18,65 ± 0,20	17,93 ± 0,68	16,07 ± 1,77	18,58 ± 0,25	17,81 ± 0,94	15,89 ± 1,67
L11	16,43 ± 0,35	15,25 ± 0,32	13,97 ± 0,79	16,23 ± 0,32	14,99 ± 0,75	13,80 ± 0,64
L12	5,46 ± 0,35	4,96 ± 0,88	4,26 ± 0,20	5,56 ± 0,15	4,68 ± 0,54	4,04 ± 0,16
L13	6,15 ± 0,10	6,72 ± 1,09	5,74 ± 0,55	6,37 ± 0,17	6,67 ± 1,21	5,6 ± 0,58

Valores representam média±desvio-padrão. CS, Controle salina (n=5). AS, Azeite salina (n=5). BS, Busulfan Salina (n=5). CT, Controle triptofano (n=5). AT, Azeite triptofano (n=5). BT, Busulfan triptofano (n=5). ^aBusulfan salina vs Azeite salina e Controle salina. ^bAzeite triptofano vs Controle triptofano. ^cBusulfan triptofano vs Azeite triptofano e Controle triptofano. ANOVA two-way múltiplas comparações e teste post-hoc de Tukey's, p<0.05.

Por fim, com relação à análise morfométrica do córtex somatossensorial, houve redução significativa no número de neurônios contados por unidade de área nos animais do grupo Busulfan quando comparado com os animais do grupo Controle (Controle Salina: 46,72 ± 1,32 vs Busulfan Salina: 38,07 ± 4,32, Controle Triptofano: 45,17 ± 1,58 vs Busulfan Triptofano: 33,36 ± 5,29, p<0.05) (Figura 9A). Não houve diferença entre os animais que receberam triptofano e salina (Figura 9 A, B e C). Além disso, houve diminuição significativa na área dos neurônios dos animais do grupo Busulfan quando comparado com os animais do grupo Azeite e Controle (Controle Salina: 445,94 ± 30,91, Azeite Salina: 357,65 ± 40,56 vs Busulfan Salina: 265,06 ± 41,34, Controle Triptofano: 405,65 ± 58,48, Azeite triptofano: 385,72 ± 33,61 vs Busulfan Triptofano: 279,88 ± 30,70, p<0.05) (Figura 10A). Não houve diferença entre os animais que receberam triptofano e salina (Figura 10 A, B, C e D).

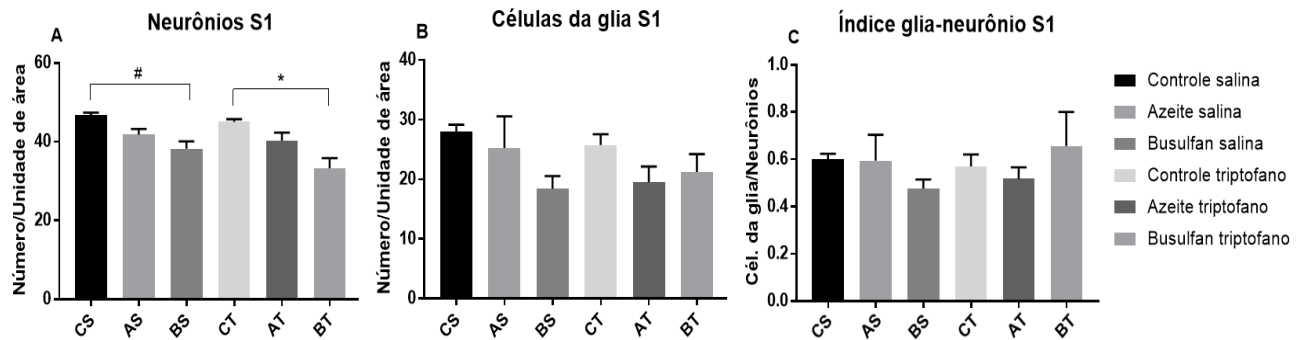


Figura 9. Efeito da intervenção com triptofano sobre o número de neurônios e células da glia. O número de células foi avaliado por unidade de área ($1365.84 \mu\text{m}^2$) na camada V do córtex somatossensorial (S1). **(A)** Número de neurônios no córtex S1. **(B)** Número de células da glia no córtex S1. **(C)** Índice células da glia-neurônios no córtex S1. CS, Controle salina (n=4). AS, Azeite salina (n=4). BS, Busulfan Salina (n=5). CT, Controle triptofano (n=4). AT, Azeite triptofano (n=4). BT, Busulfan triptofano (n=4). #Busulfan salina vs Controle salina. *Busulfan triptofano vs Controle triptofano. Valores representam média±erro padrão da média. ANOVA two-way múltiplas comparações e teste post-hoc de Tukey's, $p < 0.05$.

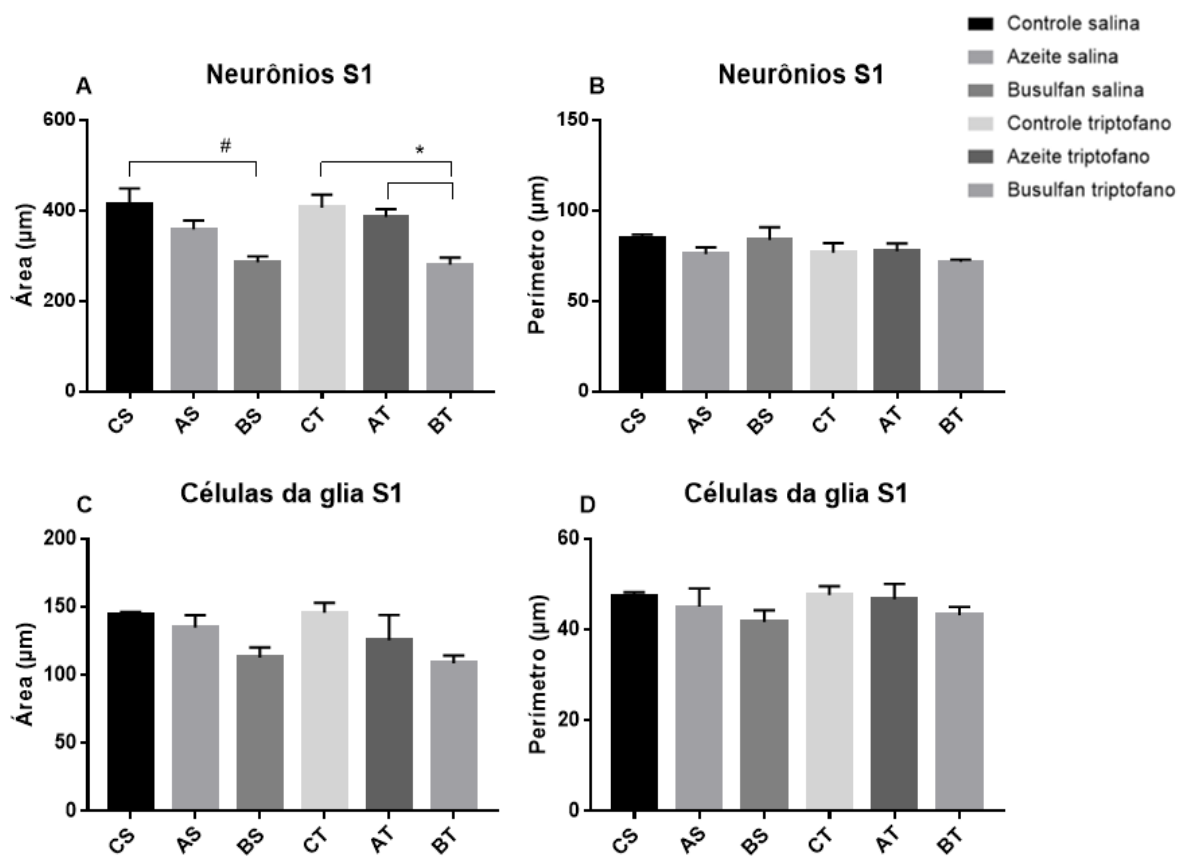


Figura 10. Efeito da intervenção com triptofano sobre a área e perímetro de neurônios e células da glia. As avaliações foram realizadas em neurônios e células da glia na camada V do córtex somatossensorial (S1). **(A)** Área em micrômetros de neurônios no córtex S1. **(B)** Perímetro em micrômetros de neurônios no córtex S1.

(C) Área em micrômetros de células da glia no córtex S1. **(D)** Perímetro em micrômetros de células da glia no córtex S1. O número de células foi avaliado por unidade de área ($1365.84 \mu\text{m}^2$). CS, Controle salina (n=4). AS, Azeite salina (n=4). BS, Busulfan Salina (n=5). CT, Controle triptofano (n=4). AT, Azeite triptofano (n=4). BT, Busulfan triptofano (n=4). #Busulfan salina vs Controle salina. *Busulfan triptofano vs Azeite triptofano e Controle triptofano. Valores representam média \pm erro padrão da média. ANOVA two-way múltiplas comparações e teste post-hoc de Tukey's, $p < 0.05$.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos três populações de ratos, uma primeira proveniente de ratas que receberam apenas salina, uma segunda oriunda de ratas que receberam apenas o veículo do fármaco, e uma terceira procedente de ratas que passaram pela intervenção de um agente farmacológico indutor de microcefalia. Com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação com baixa dose do aminoácido triptofano sobre os grupos descritos, avaliamos um conjunto de parâmetros, tais como indicadores murinométricos do desenvolvimento, desenvolvimento das características somáticas, ontogênese de reflexos, medidas craniofaciais e morfometria do córtex somatossensorial. Todos os animais do grupo Busulfan apresentaram microcefalia, ou seja, redução de um ou ambos os eixos cranianos no primeiro dia de vida (EAPC e ELLC). Além disso, os animais apresentaram atraso na maturação de reflexos (preensão palmar, recuperação de decúbito, colocação pelas vibrissas e queda livre) e características somáticas (erupção dos incisivos superiores e inferiores), e redução no número e área de neurônios no córtex somatossensorial. Não foi observado efeito da suplementação com baixa dose de L-triptofano em nenhum dos parâmetros avaliados.

Das medidas murinométricas avaliadas, ressaltamos a redução nos eixos ELLC e no EAPC nos filhotes do grupo Busulfan. Em roedores, o crânio não se desenvolve como uma única unidade, ele possui duas regiões distintas, o neurocrânio e o viscerocrânio (CHEVERUD, 1982). O viscerocrânio é utilizado durante a alimentação e a respiração (CHEVERUD, 1982; HERRING, 1993), já o neurocrânio abriga o cérebro e seu desenvolvimento é principalmente influenciado pelo crescimento do o mesmo (YOUNG, 1959). De acordo com o estudo realizado por Miller e German (1999), foi possível definir que o eixo EAPC representa tanto o viscerocrânio quanto o neurocrânio, tendo em vista que sua medida é feita da ponta anterior do osso nasal até a borda posterior do osso occipital (MILLER; GERMAN, 1999; BARROS, 1999). O eixo ELLC, por sua vez, representa apenas o neurocrânio, pois sua medida é realizada da linha temporal direita até a esquerda do osso parietal (MILLER; GERMAN, 1999; BARROS, 1999). Assim, a redução do ELLC em todo o período de lactação consiste num bom indicativo de tamanho encefálico (MILLER;

GERMAN, 1999). De acordo com Miller e German (1999) e Clark e Smith (1993), o neurocrânio, ao nascimento, já completou a maior parte do seu crescimento, diferente do viscerocrânio, que cresce de forma mais rápida até atingir proporções adultas adequadas (MILLER; GERMAN, 1999; CLARK; SMITH, 1993). Isso pode explicar porque diferenças significantes no eixo EAPC não foram observadas nos primeiros dias de vida.

A redução destes eixos pode ser considerada um resultado semelhante à redução da circunferência craniana observada em humanos, utilizada para o diagnóstico da microcefalia (WHO, 2014). Em humanos, a redução desta circunferência é um indicativo de más-formações no encéfalo, como a redução da massa encefálica, hipoplasia de áreas corticais e corpo caloso, bem como desproporcionalidades entre as áreas encefálicas (HUANG *et al.* 2016b; FURUKAWA *et al.*, 2007; BARCHOVICH; PEACOCK, 1998). Assim como em humanos, a redução dos eixos cranianos em ratos é um indício de hipoplasia do cérebro (FURUKAWA *et al.*, 2007). Consequências frequentemente observadas em indivíduos microcefálicos, como declínio de funções cognitivas, avaliado a partir dos índices de quociente de inteligência, são atribuídas a essas más-formações no encéfalo (DORMAN, 1991). Além disso, observam-se desordens motoras, como a disfagia, apraxia, movimentos espasmódicos e convulsões generalizadas (LEAL *et al.* 2017; KORTÜM *et al.* 2009). Os mecanismos responsáveis por ocasionar a hipoplasia aparente estão relacionados com a via mitocondrial intrínseca dependente da proteína p53 (VALDEZ *et al.*, 2010; OHIRA *et al.*, 2013b). A p53 é uma proteína supressora de tumor que regula vários processos celulares, como a senescência e a morte, em resposta a diferentes formas de estresse (LAPTENKO; PRIVES, 2006).

A ontogênese de reflexos, por envolver uma sequência simultânea de eventos e participação de várias regiões do sistema nervoso central (SNC), é considerada um indicador do desenvolvimento e maturação do mesmo (SMART; DOBBING, 1971; FOX, 1965). Os animais do grupo Busulfan apresentaram retardo no desaparecimento da preensão palmar (PP) e na maturação da recuperação de decúbito (RD), colocação pelas vibrissas (CV) e queda livre (QL). O reflexo de preensão palmar é classificado como inato e desaparece à medida que o SNC

amadurece, assim, o retardo no seu desaparecimento pode sugerir subdesenvolvimento ou danos no SNC (ADLARD; DOBBING, 1971). Com relação aos reflexos adquiridos durante o desenvolvimento, podemos citar o reflexo de queda livre e recuperação de decúbito, que aparecem com o amadurecimento do SNC e exigem a coordenação dos membros e equilíbrio (CASSYDI *et al.*, 1994). O cerebelo e a medula espinhal estão envolvidos na atividade destes reflexos (CASSYDI *et al.*, 1994). Barchovich e Peacock (1998) relataram que é elevada, na microcefalia, a incidência de indivíduos que apresentam cerebelos desproporcionalmente pequenos (BARCHOVICH; PEACOCK, 1998). Assim, o retardo no aparecimento da RD e QL sugere que os animais microcefálicos possam apresentar cerebelo desproporcionalmente pequeno como documentado em humanos. Em ratos, Ohira *et al.* (2013) relataram pela primeira vez a presença de hipoplasia aparente no cerebelo de animais submetidos ao *Busulfan* (OHIRA *et al.*, 2013). Diante do exposto, a avaliação dos reflexos nos fornece um indicativo de subdesenvolvimento do SNC dos animais do grupo *Busulfan*, já que envolvem diferentes áreas do SNC e englobam reflexos inatos, como a PP, e adquiridos, como a QL e a RD.

No tocante ao desenvolvimento somático, dentre as características avaliadas, observamos retardos na erupção dos incisivos inferiores e superiores (EII e EIS) nos animais do grupo *Busulfan*. Este parâmetro depende de uma sequência de eventos, que inclui o movimento do dente do osso alveolar, encontrado na arcada alveolar (na mandíbula), para dentro da cavidade oral (WISE *et al.*, 2008). Assim, é importante salientar que o desenvolvimento da mandíbula pode influenciar diretamente na erupção dos incisivos. Portanto, o retardo na erupção pode estar relacionado com alterações craniofaciais presentes em microcefálicos, como observado neste estudo pelas medidas craniofaciais no dia 28 pós-natal. A maioria das medidas craniofaciais que apresentaram diferença significativa (L1, L2, L3 e L9) são medidas do crânio que indicam redução parâmetros diferentes dos observados no período de lactação. Assim, junto com os dados encontrados dos eixos ELLC e EAPC realizados no período da lactação, a redução destas medidas constata o desenvolvimento comprometido do crânio como um todo nos animais do grupo *Busulfan*. Tais medidas representam medidas do viscerocrânio (L1, L2 e L9) e do neurocrânio (L3)

(MILLER; GERMAN, 1999). Ainda houve diferença significativa nas medidas L4, L5 e L6, que representam medidas da mandíbula e correspondem ao viscerocrânio (MILLER; GERMAN, 1999). Alterações na mandíbula são comuns em indivíduos que são portadores de anormalidade no crânio (HUANG *et al.*, 2016a). Isso pode ocorrer especialmente com a microcefalia, onde as alterações cranianas afetam também a mandíbula, refletindo malformações como disostose (HUANG *et al.* 2016a) e redução da abertura mandibular (LEAL *et al.*, 2017). Câmara *et al.* (1992) sugerem uma estreita relação entre o desenvolvimento dos maxilares e erupção de dentes com alterações craniais, como a microcefalia (CÂMERA *et al.*, 1992).

Com relação ao peso corporal, os resultados indicam tendência de redução de peso corporal no período de lactação nos filhotes do grupo Busulfan, entretanto, os resultados foram significativos apenas nos dias 19 e 21 no período de lactação. Além disso, não houve diferença entre os grupos que receberam triptofano quando comparado com os controles, ou seja, o peso corporal não foi influenciado pela suplementação de triptofano. Nossos achados diferem dos encontrados por Silva (2018), que observou redução do peso corporal em animais submetidos a um modelo experimental de paralisia cerebral suplementados com triptofano, entretanto, a dose de triptofano utilizada foi cinco vezes maior do que a utilizada neste estudo (SILVA, 2018). Ademais, Silva (2018) relatou melhora da eficiência mastigatória dos animais aos 21 dias de vida (SILVA, 2018). De maneira geral, observa-se a presença do “fenótipo magro” em ratos jovens e adultos em estudos que manipularam o sistema serotoninérgico no período neonatal (GALINDO *et al.*, 2015; PINHEIRO *et al.*, 2017). Assim, sugere-se que a dose utilizada neste estudo não foi suficiente para ocasionar modificações significantes no peso corporal.

Como observado, os resultados de medidas murinométricas, ontogênese de reflexos e desenvolvimento das características somáticas encontrados neste estudo apontam para um subdesenvolvimento do SNC nos animais do grupo Busulfan. Os resultados obtidos a partir da análise morfométrica do córtex S1, na área correspondente aos membros posteriores, corroboram com esses resultados. Essa área foi escolhida devido à possibilidade da presença de alterações motoras associadas à microcefalia (COFFITO, 2016; FLOR *et al.*, 2017). Além disso, estudos experimentais demonstraram que alterações no padrão de movimento são

responsáveis por ocasionar alterações nessa área (COQ *et al.*, 2008). As análises estatísticas demonstraram redução significativa do número e da área de neurônios nos animais do grupo Busulfan. Diversas pesquisas demonstraram o efeito do *Busulfan* no desenvolvimento do SNC, entretanto, diferente do nosso estudo, os pesquisadores avaliaram efeitos em fetos após a aplicação nas gestantes (FURUKAWA *et al.*, 2007; OHIRA *et al.*, 2009) ou diretamente nos filhotes aplicados durante o período de lactação (OHIRA *et al.*, 2013). Além disso, nenhuma análise de áreas específicas do córtex cerebral foi realizada até o momento. Furukawa *et al.* (2007) relataram microcefalia em fetos de gestantes expostas ao *Busulfan* (10 mg/kg; dias 12, 13 e 14 de gestação), apontando para o aumento da apoptose e inibição da mitose do epitélio neural como os indutores (FURUKAWA *et al.*, 2007). As avaliações foram realizadas nos fetos nos dias 14.5, 15, 16 e 21 da gestação (FURUKAWA *et al.*, 2007). Ohira *et al.* (2009) demonstraram a presença de células picnóticas nos fetos 24, 36, 48, 72 e 96 horas após a administração de *Busulfan* (30 mg/kg) em gestantes (dia 13 de gestação). O telencéfalo, o diencéfalo, o mesencéfalo, o metencéfalo e a medula espinhal foram as áreas comprometidas (OHIRA *et al.*, 2009). Assim, diferente das pesquisas citadas, o nosso estudo demonstrou a presença de danos em longo prazo associados à microcefalia ocasionada pela exposição ao *Busulfan* durante a gestação.

Como observado anteriormente, a administração de triptofano ocasiona aumento da serotonina no cérebro por aumentar a disponibilidade de triptofano (FERNSTROM; WURTMAN, 1972; HALEEM *et al.*, 1998). A serotonina, por sua vez, possui importante papel durante o desenvolvimento precoce, morfogênese craniofacial e desenvolvimento cortical (VITALIS; PARNAVELAS, 2003; BUZNIKOV *et al.*, 1996; BURDEN; LAWRENCE, 1973). Porém, diversos estudos experimentais que utilizaram inibidores seletivos da recaptação de serotonina demonstraram efeitos negativos em parâmetros observados neste estudo. Deiró *et al.* (2008) demonstraram retardo na maturação dos reflexos de PP, RD, CV, GN, RS e RD em animais tratados com o ISRS Citalopram (10mg/kg) no período neonatal (DEIRÓ *et al.*, 2008). De forma semelhante, após a aplicação de 15 mg/kg de Sertralina, outro ISRS, os animais apresentaram retardo na erupção dos incisivos e abertura do conduto e pavilhão auditivo (DEIRÓ *et al.*, 2006). Os ISRS também ocasionaram

redução do crescimento corporal e diminuição das medidas cranianas, como observado após a administração de 10mg/kg de Citalopram (MAGALHÃES *et al.*, 2006). Com relação ao triptofano, as evidências indicam que a utilização de doses entre 70 e 200mg/kg pode estar relacionada com efeitos negativos como tremor, náusea e tonturas (FERNSTROM *et al.*, 2012). Neste estudo, utilizamos uma baixa dose de triptofano (10mg/kg), relatada como sendo suficiente para aumentar os níveis de serotonina em 0-15% (TRULSON; JACOBS, 1976). Todavia, a administração de triptofano não foi capaz de influenciar positiva ou negativamente nenhum dos parâmetros observados.

O triptofano, diferente dos inibidores seletivos da recaptação de serotonina, pode seguir por 3 vias metabólicas diferentes: serotonina, quirunenina e síntese proteica (FUKUWATARI; SHIBATA, 2013). Além disso, a serotonina, quando produzida, pode produzir o hormônio melatonina, conhecido como hormônio do sono (MOHAMMAD-ZADEH *et al.*, 2008). Assim, é possível que os resultados encontrados neste estudo sejam decorrentes de: 1- a serotonina produzida não foi suficiente para influenciar os parâmetros observados; 2- a serotonina produzida pode ter influenciado outros parâmetros como comportamento alimentar e comportamento depressivo (TEIK; ANDERSON, 1992; SHABBIR *et al.*, 2013); 3- o triptofano não ocasionou modificações significativas nas concentrações de serotonina, mas pode ter influenciado as concentrações de quirunenina. Cerca de ~90% do triptofano ingerido segue para a síntese da quirunenina, considerada a segunda via metabólica mais prevalente do triptofano após a síntese proteica (SAINIO *et al.*, 1996; DOUGHERTY *et al.*, 2008). A quinurenina, diferente da serotonina, pode passar pela barreira hematoencefálica e produzir metabólitos neuroativos que modulam a sinalização glutamatérgica e colinérgica (CAPURON; MILLER, 2011). Assim, é possível que a exposição ao L-triptofano tenha influenciado outros parâmetros durante o período de lactação não avaliados neste estudo.

Este trabalho possui algumas limitações. Em primeiro lugar, não avaliamos os mecanismos relacionados à redução de neurônios encontrados em nosso estudo. No entanto, como visto anteriormente, estudos relataram que a microcefalia associada ao Busulfan é causada pelo aumento da apoptose associada a via mitocondrial intrínseca dependente de p53. Além disso, não avaliamos doses acima

de 10 mg/kg de Busulfan. Embora a literatura sugira que 30 mg/kg seja considerada uma dose moderada, não obtivemos sucesso com esta quantidade. Por fim, não podemos extrapolar os resultados para todo o cérebro devido à avaliação de apenas duas áreas do córtex primário. Por outro lado, os resultados obtidos após a avaliação da maturação dos reflexos e características físicas sugerem que outras áreas, como cerebelo, medula espinhal e tecido ocular, foram negativamente afetadas pela microcefalia associada ao Busulfan.

8 CONCLUSÕES

A exposição ao L-triptofano durante o período de lactação não influenciou o desenvolvimento dos animais em nenhum dos parâmetros observados quando comparado ao controle. Por outro lado, a exposição ao *Busulfan* durante a gestação influenciou negativamente, durante o período de lactação, os eixos cranianos, maturação de reflexos e características somáticas. Após o período de lactação, no dia 28, houve redução de medidas craniofaciais e redução do número e área de neurônios no córtex somatossensorial. Com base nesses achados, refutamos a hipótese de que o tratamento neonatal com baixa dose de L-triptofano melhora o desenvolvimento das características somáticas, maturação de reflexos, estrutura craniofacial e encefálica, em ratos submetidos a modelo experimental de microcefalia.

8.1 PERSPECTIVAS

Devido às diversas possibilidades observadas anteriormente, propõe-se como perspectivas:

- Quantificar as concentrações de serotonina no encéfalo após administração neonatal de baixa dose do L-triptofano;
- Analisar a expressão dos receptores serotoninérgicos de regiões do encéfalo como córtex somatossensorial, córtex motor e cerebelo;
- Avaliar os efeitos do tratamento com baixa dose de L-triptofano em testes comportamentais (labirinto elevado em cruz, campo aberto e paradigma da exploração livre) e comportamento alimentar;
- Avaliar os efeitos do tratamento com baixa dose de L-triptofano em músculos periféricos;
- Quantificar as concentrações periféricas de quinurenina e/ou metabólitos da via da quinurenina, como a vitamina B3 (niacina).

REFERÊNCIAS

ABRAMOWITZ, L. K.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. **Curr Opin Genet Dev**, v. 22, n. 2, p. 72-8, Apr 2012.

ABUELO, D. Microcephaly syndromes. **Semin Pediatr Neurol**, v. 14, n. 3, p. 118-27, Sep 2007.

ADLARD, B. P.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. 3. Development of four enzymes in the brains of normal and undernourished rats. **Brain Res**, v. 28, n. 1, p. 97-107, Apr 1971.

ARAGAO, M. D. F. V.; VAN DER LINDEN, V.; BRAINER-LIMA, A. M., *et al.* Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **British Medical Journal**, v. 353, i1901, Apr 2016.

ASHWAL, S. *et al.* Practice parameter: Evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. **Neurology**, v. 73, n. 11, p. 887-97, Sep 2009.

BARASSIN, S. *et al.* Circadian tryptophan hydroxylase levels and serotonin release in the suprachiasmatic nucleus of the rat. **Eur J Neurosci**, v. 15, p. 833–40, Mar 2002.

BARKER, D. J. *et al.* Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **British Medical Journal**, v. 301, n. 6746, p. 259-62, Aug 1990.

BARKOVICH, A. J.; PEACOCK, W. Sublobar dysplasia: a new malformation of cortical development. **Neurology**, v. 50, n. 5, p. 1383-7, May 1998.

BARROS, M. L. D. *et al.* Long term effects of neonatal exposure to fluoxetine on energy balance: a systematic review of experimental studies. **Eur J Pharmacol**. v. 15, n. 833, p. 298-306, Aug 2018.

BAX, M. *et al.* Proposed definition and classification of cerebral palsy. **Dev Med Child Neurol**, v. 47, n. 8, p. 571-6, Aug 2005.

BERGER, M.; GRAY, J. A.; ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. **Annu Rev Med**, v. 60, p. 355-66, 2009.

BIEL, M.; WASCHOLOWSKI, V.; GIANNIS, A. Epigenetics--an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. **Angew Chem Int Ed Engl**, v. 44, n. 21, p. 3186-216, May 2005.

BISHOP, J. B.; WASSOM, J. S. Toxicological review of busulfan (Myleran). **Mutat Res**, v. 168, n. 1, p. 15-45, Jul 1986.

BURDEN, R. W.; LAWRENCE, I. E. Presence of biogenic amines in early rat development. **Am J Anat**, v. 136, p. 251 – 257, Feb 1973.

BUZNIKOV, G. A.; SHMUKLER, Y. B.; LAUDER, J. M.. From oocyte to neuron: do neurotransmitters function in the same way throughout development? **Cell Mol Neurobiol**, v. 16, p. 533-559, Oct 1996.

CÂMERA, G. *et al.* Single maxillary central incisor and holoprosencephaly. **Pathologica**, v.84, n. 1091, p. 425-8, May-Jun 1992.

Capuron L.; Miller A. H. Immune system to brain signaling: neuropsychopharmacological implications. **Pharmacol. Ther.** v. 130, n. 2, p. 226–238, May 2011.

CARD, J. P.; MOORE, R. Y. Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. **J Comp Neurol**, v. 284, p. 135–147, Jun 1989.

CASSIDY, G. *et al.* The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. **Brain Behav Evol**, v. 43, n. 4-5, p. 244-53, 1994.

CHEVERUD, J. M. Phenotypic, Genetic, and Environmental Morphological Integration in the Cranium. **Evolution**, v. 36, n. 3, p. 499-516, May 1982.

CHVASSUS-AU-LOUIS, N.; RAFIKI, A.; JORQUERA, I.; BEN-ARI, Y.; REPRESA, A. Neocortex in the hippocampus: an anatomical and functional study of CA1

heterotopias after prenatal treatment with methylazoxymethanol in rats. **J Comp Neurol**, 394: 520–536, May 1998.

CLARK, C. T.; SMITH, K. K. Cranial osteogenesis in *Monodelphis domestica* (Didelphidae) and *Macropus eugenii* (Macropodidae). **J Morphol**, v. 215, n. 2, p. 119-49, Feb 1993.

COFFITO. Sistema COFFITO/CREFITOs. Diagnóstico: Microcefalia. E agora?. 2016, 12 p.

COMB, M.; GOODMAN, H. M. CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. **Nucleic Acids Res**, v. 18, n. 13, p. 3975-82, Jul 1990.

COQ, J. O. *et al.* Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. **Exp Neurol**, v. 210, n. 1, p. 95-108, Mar 2008.

DAHL, M.; THOMMESSEN, M.; RASMUSSEN, M.; SELBERG, T. Feeding and nutritional characteristics in children with moderate or severe cerebral palsy. **Acta Paediatr**, v. 85, p. 697–701, Jun 1996.

D'ALESSIO, A. C.; SZYF, M. Epigenetic tête-à-tête: the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. **Biochem Cell Biol**, v. 84, p. 463-76, Aug 2006.

DA SILVA ARAGAO, R. *et al.* Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. **Acta Physiol**, v. 210, n. 1, p. 70-83, Jan 2014.

DAUBERT, E. A.; CONDRON, B. G. Serotonin: a regulator of neuronal morphology and circuitry. **Trends Neurosci**, v. 33, n. 9, p. 424-434, Sep 2010.

DEIRO, T. C. *et al.* Neonatal exposure to citalopram, a serotonin selective reuptake inhibitor, programs a delay in the reflex ontogeny in rats. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 66, n. 3B, p. 736-40, 2008.

DEIRO, T. C. *et al.* Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. **Physiol Behav**, v. 87, n. 2, p. 338-44, Feb 2006.

DEIRO, T. C. *et al.* Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 10, p. 1503-9, Oct 2004.

DEL ANGEL-MEZA, A. R.; DÁVALOS-MARÍN, A. J.; ONTIVEROS-MARTINEZ, L. L.; ORTIZ, G. G.; BEAS-ZARATE, C.; CHAPARRO-HUERTA, V. *et al.* Protective effects of tryptophan on neuro-inflammation in rats after administering lipopolysaccharide. **Biomed Pharmacother**, v. 65, n. 3, p. 215–9, Jun 2011.

DESESSO, J. M. Comparative features of vertebrate embryology. In: Developmental and reproductive toxicology. A practical approach. 2nd ed. Hood R.D. (ed). **Taylor & Francis**, p. 147-197, 2005.

DE SOUZA, S. L. *et al.* Differential effects on somatic and reflex development by chronic clomipramine treatment. **Physiol Behav**, v. 82, n. 2-3, p. 375-9, Sep 2004.

DORMAN, C. Microcephaly and intelligence. **Dev Med Child Neurol**, v. 33, n. 3, p. 267-9, Mar 1991.

DOUGHERTY, D. M. *et al.* Comparison of 50- and 100-g L -tryptophan depletion and loading formulations for altering 5-HT synthesis: pharmacokinetics, side effects, and mood states. **Psychopharmacology**, v. 198, n. 3, p. 431-45, Jun 2008.

DUDLEY, T. E.; DINARDO, L. A.; GLASS, J. D. Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. **J Neurosci**, v. 18, p. 5045–52, Jul 1998.

DUNCAN, E. J.; GLUCKMAN, P. D.; DEARDEN, P. K. Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype? **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, v. 322, n. 4, p. 208-20, Jun 2014.

EGGER, G. *et al.* Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, n. 6990, p. 457-63, Jun 2004.

FEINBERG, A. P. Cancer epigenetics take center stage. **PNAS**. v. 98, n. 2, p. 392-94, Jan 2001.

FERNSTROM, J. D.; WURTMAN, R. J. Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. **Science**, v. 178, n. 4059, p. 414-6, Oct 1972.

FERNSTROM, J. D. Dietary precursors and brain neurotransmitter formation. **Annu Rev Med**, v. 32, p. 413-25, 1981.

FERNSTROM, J. D. Effects and side effects associated with the non-nutritional use of tryptophan by humans. **J Nutr**, v. 142, n. 12, p. 2236S-2244S, Dec 2012.

FLOR, C. J. D. R. V.; GUERREIRO, C. F.; DOS ANJOS, J. L. M. Desenvolvimento neuropsicomotor em crianças com microcefalia associado ao Zika Vírus. **Revista Pesquisa em Fisioterapia**, v. 7, n. 3, p. 313-318, 2017.

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Anim Behav**, v. 13, n. 2, p. 234-41, Apr-Jul 1965.

FRANÇA, G. V. *et al.* Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 891-7, Aug 2016.

FRIEDMAN, J. *et al.* Sepiapterin reductase deficiency: A Treatable Mimic of Cerebral Palsy. **Annals of neurology**, v. 71, p. 520-530, Apr 2012.

FUKUWATARI, T.; SHIBATA, K. Nutritional aspect of tryptophan metabolism. **Int J Tryptophan Res**, v. 6, n. Suppl 1, p. 3-8, Jul 2013.

FUNAHASHI, A.; FUJIMIYA, M.; KIMURA, H.; MAEDA, T. Abnormal development of serotonin nerve fibers in the visual cortex in rats with methylazoxymethanol-induced microcephaly. **Acta Neuropathol**, v. 95, n. 1, p. 5-14, Jan 1998.

FURUKAWA, S. *et al.* Indole-3-acetic acid induces microencephaly in rat fetuses. **Toxicol Pathol**, v. 32, n. 6, p. 659-67, Nov-Dec 2004.

FURUKAWA, S. *et al.* Microencephaly and microphthalmia in rat fetuses by busulfan. **Histol Histopathol**, v. 22, n. 4, p. 389-97, Apr 2007.

GALINDO, L. C. *et al.* Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. **Int J Dev Neurosci**, v. 46, p. 76-81, Nov 2015.

GARLAND JR, T.; KELLY, S. A. Phenotypic plasticity and experimental evolution. **J. Exp. Biol**, v. 209, p. 2344–2361, Jun 2006.

GEROZISSIS, K. Brain insulin and feeding: a bi-directional communication. **Eur J Pharmacol**, v. 490, n. 1-3, p. 59-70, Apr 2004.

GERTZ, J. *et al.* Genistein and bisphenol A exposure cause estrogen receptor 1 to bind thousands of sites in a cell type-specific manner. **Genome Res**, v. 22, n. 11, p. 2153-62, Nov 2012.

GERTZ, J. *et al.* Distinct properties of cell-type-specific and shared transcription factor binding sites. **Mol Cell**, v. 52, n. 1, p. 25-36, Oct 2013.

GLASS, J. D; DINARDO, L. A.; EHLEN, J. C. Dorsal raphe nuclear stimulation of SCN serotonin and circadian phase-resetting. **Brain Res**, v. 859, p. 224–232, Mar 2000.

GLORE, S. R.; LAYMAN, D. K. Cellular Development of Skeletal Muscle during Early Periods of Nutritional Restriction and Subsequent Rehabilitation. **Pediatr Res**, v. 17, p. 602-605, Jul 1983.

GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. A. Mismatch: why our world no longer fits our bodies. Oxford, UK: **Oxford University Press**, 2006.

GLUCKMAN, P. D., M. A. HANSON, AND A. S. BEEDLE. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. **Am J Hum Biol**, v. 19, p. 1-19, Jan-Feb 2007.

HALES, C. N. *et al.* Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **British Medical Journal**, v. 303, n. 6809, p. 1019-22, Oct 1991.

HALEEM, D. J.; JABEEN, B. T.; PARVEEN, T. Inhibition of restraint-induced anorexia by injected tryptophan. **Life Sci**, v. 63, p. 205 –212, 1998.

HALEEM, D. J. Improving therapeutics in anorexia nervosa with tryptophan. **Life Sciences**, v. 178, p. 87 – 93, Jun 2017.

HAZIN, A. N. *et al.* Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. **N Engl J Med**, v. 374, n. 22, p. 2193-5, Jun 2016.

HERRING, S. W. Formation of the Vertebrate Face: Epigenetic and Functional Influences. **American Zoologist**, v. 33, n. 4, p. 472-483, 1993.

HEYSER, C. J. Assessment of developmental milestones in rodents. **Curr Protoc Neurosci**, v. Chapter 8, p. Unit 8 18, Feb 2004.

HORNUNG, J. P. The human raphe nuclei and the serotonergic system. **J Chem Neuroanat**, v. 26, p. 331-43, Dec 2003.

HUANG, L. *et al.* Mandibulofacial Dysostosis with Microcephaly: Mutation and Database Update. **Hum Mutat**, v. 37, n. 2, p. 148-54, Feb 2016a.

HUANG, W. C. *et al.* Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. **Sci Rep**, v. 6, p. 34793, Oct 2016b.

JOHNSTON M. V.; COYLE J. T. Cytotoxic lesions and the development of transmitter systems. **Trends Neurosci**, v. 5, p. 153–156, Jan 1982.

JONES, D. G.; DYSON, S. E. The influence of protein restriction, rehabilitation and changing nutritional status on synaptic development: a quantitative study in rat brain. **Brain Res**, v. 208, n. 1, p. 97-111, Mar 1981.

JONNAKUTY, C.; GRAGNOLI, C. What do we know about serotonin?. **J Cell Physiol**, v. 217, n. 2, p. 301-6, Nov 2008.

KARA, C. *et al.* In vivo assessment of zinc deficiency on craniofacial growth in a rat model. **Eur J Dent**, v. 3, n. 1, p. 10-5, Jan 2009.

KESZTHELYI, D.; TROOST, F. J.; MASCLÉE, A. A. Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. **Neurogastroenterol Motil**, v. 21, n. 12, p. 1239-49, Dec 2009.

KORTUM, F. *et al.* The core FOXP1 syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis. **J Med Genet**, v. 48, n. 6, p. 396-406, Jun 2011.

KOSOFKY, B. E.; MOLLIVER, M. E. The serotonergic innervation of cerebral cortex: Different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. **Synapse**, v. 1, n. 2, p. 153–168, 1987.

LAM, Daniel D. *et al.* Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 97, n. 1, p. 84-91, Nov 2010.

LAPTENKO, O.; PRIVES, C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 6, p. 951-61, Jun 2006.

LEAL, M. C. *et al.* Characteristics of Dysphagia in Infants with Microcephaly Caused by Congenital Zika Virus Infection, Brazil, 2015. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 8, p. 1253-1259, Aug 2017.

LE FLOCH, N.; OTTEN, W.; MERLOT, E. Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. **Amino Acids**, v. 41, n. 5, p. 1195-205, Nov 2011.

LIDOV, H. G. W.; MOLLIVER, M. E. A immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: ascending pathways and terminal fields. **Brain Res Bull**, v. 8, p. 389– 416, Apr 1982.

MAGALHAES, C. P. *et al.* Efeitos do tratamento neonatal com inibidor seletivo de recaptura da 5-HT sobre o desenvolvimento anatômico crânio-encefálico. **Arq. Neuro-Psiquiatr**, v. 64, n.4, p. 990-993, 2006.

MARCUZZO, S. *et al.* Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. **Brain.Dev**, v. 32, n. 4, p. 323-331, Apr 2010.

MARINHO, F. *et al.* Microcephaly in Brazil: prevalence and characterization of cases from the Information System on Live Births (Sinasc), 2000-2015. **Epidemiol Serv Saude**, v. 25, n. 4, p. 701-712, Sep 2016.

MARTIN, T. G. Serotonin syndrome. **Ann Emerg Med**. v. 28, n. 5, p. 520-6, Winter 1996.

MARTINES, R. B. *et al.* Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. **Lancet**, v. 388, n. 10047, p. 898-904, Aug 2016.

MATEOS, S. S. *et al.* Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 104, n. 1, p. 52-9, Jan 2009.

MILLER, J. P.; GERMAN, R. Z. Protein malnutrition affects the growth trajectories of the craniofacial skeleton in rats. **J Nutr**, v. 129, n. 11, p. 2061-9, Nov 1999.

MINISTRY OF HEALTH OF BRAZIL. Health Surveillance Department. Integrated guidelines for surveillance and health care in the context of the Public Health Emergency of National Concern (PHEIC): procedures for monitoring changes in growth and development from gestation to early childhood, related to Zika virus infection and other infectious diseases within the operational capacity of the SUS. Brasília, DF, 2017a. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/19/Executive-Summary.pdf>>

MINISTRY OF HEALTH OF BRAZIL. Health Surveillance Department. Zika virus in Brazil: the SUS response. Brasília, 2017b. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/21/zika-virus-in-brazil-2017.pdf>>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 15 de 2018. Volume 49 | Maio 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/13/bol-etim-epidemiologico.pdf>>

MINER, J. J. *et al.* Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081-91, May 2016.

MITOMI, T.; KAWANO, Y.; KINOSHITA-KAWANO, S. Effect of the antineoplastic agent busulfan on rat molar root development. **Arch Oral Biol**, v. 59, n. 1, p. 47-59, Jan 2014.

MOHAMMAD-ZADEH, L. F.; MOSES, L.; GWALTNEY-BRANT, S. M. Serotonin: a review. **J Vet Pharmacol Ther**, v. 31, n. 3, p. 187-99, Jun 2008.

MOORE, K. L., PERSAUD, T. V. N., & TORCHIA, M. G. The developing human: clinically oriented embryology. **Philadelphia**, PA, Saunders/Elsevier, 2008.

NAGATA, Y.; MATSUMOTO, H. Studies on methylazoxymethanol: methylation of nucleic acid in the fetal rat brain. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** v. 132, n. 1, p. 383-5, Oct 1969.

NARDONE, R.; HOLLER, A.; THOMSCHEWSKI, P.; HOLLER, P.; LOCHNER, S.; GOLASZEWSKI, F.; BRIGO, E.; TRINKA, E. Serotonergic transmission after spinal cord injury. **J Neural Transm**, v. 122, p. 279-95, Feb 2015.

NARUSE, T. *et al.* Busulfan-induced central polydactyly, syndactyly and cleft hand or foot: a common mechanism of disruption leads to divergent phenotypes. **Dev Growth Differ**, v. 49, n. 6, p. 533-41, Aug 2007.

NG, L. T.; ANDERSON, G. H. Route of administration of tryptophan and tyrosine affects short-term food intake and plasma and brain amino acid concentrations in rats. **J Nutr**, v. 122, n. 2, p. 283-93, Feb 1992.

OHIRA, T. *et al.* Distribution and sequence of pyknotic cells in rat fetuses exposed to busulfan. **J Toxicol Pathol**, v. 22, n. 3, p. 167-71, Sep 2009.

OHIRA, T. *et al.* Busulfan-induced pathological changes of the cerebellar development in infant rats. **Exp Toxicol Pathol**, v. 65, n. 6, p. 789-97, Sep 2013.

OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Microcefalia e vírus zika. **J. Pediatr**, v. 92, n. 2, Mar-Apr 2016.

OLUSANYA, B. O. Pattern of head growth and nutritional status of microcephalic infants at early postnatal assessment in a low-income country. **Niger J Clin Pract**, v. 15, n. 2, p. 142-6, Apr-Jun 2012.

OTSUJI, M. *et al.* Developmental abnormalities in rat embryos leading to tibial ray deficiencies induced by busulfan. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 73, n. 6, p. 461-7, Jun 2005.

PALEGO, L. *et al.* Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. **J Amino Acids**, v. 2016, p. 8952520, Jan 2016.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition. **Academic Press**. 2006.

PENAGINI, F. *et al.* Dietary Intakes and Nutritional Issues in Neurologically Impaired Children. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9400-15, Nov 2015.

PEREZ, N. M. Aspectos morfológicos e morfométricos do cérebro de ratos na intoxicação crônica pelo organofosforado metamidofós. **Ver Inst Adolfo Lutz**, v. 65, n. 1, p. 50-53, Mar 2006.

PIGLIUCCI, M.; MURREN, C. J.; SCHLICHTING, C. D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2362-2367, Jun 2006.

PINHEIRO, I. L. *et al.* Neonatal fluoxetine exposure modulates serotonergic neurotransmission and disturb inhibitory action of serotonin on food intake. **Behavioural Brain Research**, Jan 2017.

PRENDERGAST, G. C.; LAWE, D.; ZIFF, E. B. Association of Myn, the murine homolog of max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and ras cotransformation. **Cell**, v. 65, n. 3, p. 395-407, May 1991.

PRESSLER, R.; AUVIN, S. Comparison of Brain Maturation among Species: An Example in Translational Research Suggesting the Possible Use of Bumetanide in Newborn. **Front Neurol**, v. 4, p. 36, Apr 2013.

REILLY, S.; SKUSE, D. Characteristics and management of feeding problems of young children with cerebral palsy. **Dev Med Child Neurol**, v. 34, n. 5, p. 379-388, May 1992.

RIBAS, V. R. *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. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 66, n. 4, p. 844-7, Dec 2008.

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

RICHARD, D. M. *et al.* L-Tryptophan: Basic Metabolic Functions, Behavioral Research and Therapeutic Indications. **Int J Tryptophan Res**, v. 2, p. 45-60, Mar 2009.

SAINIO, E. L.; PULKKI, K.; YOUNG, S. N. L-Tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological aspects. **Amino Acids**, v. 10, n. 1, p. 21-47, Mar 1996.

SCHULER-FACCINI, L. *et al.* Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 3, p. 59-62, Jan 2016.

SEYEDMAJIDI, S. A. *et al.* Effect of zinc-deficient nutrition on craniofacial bone growth in rats. **Dent Res J**, v. 11, n. 4, p. 475-80, Jul-Aug 2014.

SELEMON, L. D.; LIDOW, M. S.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Increased volume and glial density in primate prefrontal cortex associated with chronic antipsychotic drug exposure. **Biol Psychiatry**, v. 46, n. 2, p. 161-72, Jul 1999.

SEMPLE, B. D. *et al.* Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Prog Neurobiol**, v. 106-107, p. 1-16, Jul-Aug 2013.

SILVA, P. B. P Implicações do tratamento neonatal com l-triptofano associado à glicose nos parâmetros mastigatórios em ratos jovens. Dissertação (Mestrado em Bases Experimentais da Nutrição) – Pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2018.

SHABBIR, F. *et al.* Effect of diet on serotonergic neurotransmission in depression. **Neurochem Int**, v. 62, n. 3, p. 324-9, Feb 2013.

SILVA, H. J. *et al.* Protocol of Mensuration to Avaliation of Indicators of Somatic Development of Wistar Rats. **Int. J. Morphol.**, v. 23, n. 3, p. 227-230, 2005.

SILVA, C. M. *et al.* Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. **Neurosci Lett**, v. 483, n. 3, p. 179-83, Oct 2010.

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 Res**, v. 28, n. 1, p. 85-95, Apr 1971.

SODHI, M. S.; SANDERS-BUSH, E. Serotonin and brain development. **Int Rev Neurobiol**, v. 59, p. 111-74, 2004.

SQUIRES, L. N. *et al.* Serotonin catabolism and the formation and fate of 5-hydroxyindole thiazolidine carboxylic acid. **J Biol Chem**, v. 281, n. 19, p. 13463–70, May 2006.

STAVRUM, A. K. *et al.* Model of tryptophan metabolism, readily scalable using tissue-specific gene expression data. **J Biol Chem**, v. 288, n. 48, p. 34555-66, Nov 2013.

STERNBACH, H. The serotonin syndrome. **Am J Psychiatry**, v. 148, n. 6, p. 705-13, Jun 1991.

TANG, W. Y.; HO, S. M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Rev Endocr Metab Disord**, v. 8, n. 2, p. 173-82, Jun 2007.

TOSCANO, A. E.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 270-8, Mar 2008.

TRESCOT, A. M. *et al.* Opioid guidelines in the management of chronic non-cancer pain. **Pain Physician**, v. 9, n. 1, p. 1-39, Jan 2006.

TRULSON, M. E.; JACOBS, B. L. Dose-response relationships between systemically administered Ltryptophan or L-5-hydroxytryptophan and raphe unit activity in the rat. **Neuropharmacology**, v. 15, n. 6, p. 339-44, Jun 1976.

UEDA, S.; NISHIMURA, A.; KUSUKI, T.; TAKEUCHI, Y.; YOSHIMOTO, K. Delayed 5-HT release in the developing cortex of microencephalic rats. **Neuroreport**, v. 10, n.6, p. 1215-9, Apr 1999.

VALDEZ, B. C; LI, Y.; MURRAY, D.; CORN, P.; CHAMPLIN, R. E.; ANDERSSON, B. S. 5-Aza-2'-deoxycytidine sensitizes busulfan-resistant myeloid leukemia cells by regulating expression of genes involved in cell cycle checkpoint and apoptosis. **Leuk Res**, v. 34, n. 3, p. 364-72, Mar 2010.

VAN DER LINDEN, V. *et al.* Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 47, p. 1343-1348, Dec 2016.

VICTORIA, C. G. *et al.* Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? **Lancet**, v. 387, n. 10019, p. 621-4, Feb 2016.

VISCO, D. B. *et al.* Selective serotonin reuptake inhibitors affect structure, function and metabolism of skeletal muscle: A systematic review. **Pharmacol Res**, v. 136, p. 194-204, Oct 2018.

VITALIS, T.; PARNAVELAS, J. G. The role of serotonin in early cortical development. **Dev Neurosci**, v. 25, n. 2-4, p. 245-56, Mar-Aug 2003.

VOLEK, J. S. *et al.* Testosterone and cortisol in relationship to dietary nutrients and resistance exercise. **J Appl Physiol**, v. 82, n. 1, p. 49-54, Jan 1997.

VOLPI-ABADIE, J.; KAYE, A. M.; KAYE, A. D. Serotonin syndrome. **Ochsner J**, v. 13, n. 4, p. 533-40, Winter 2013.

WANG, H. *et al.* Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. **Genome Res**, v. 22, n. 9, p. 1680-8, Sep 2012.

WEI, J. W.; HUANG, K.; YANG, C.; KANG, C. S. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics. **Oncol Rep.** v. 37, n. 1, p. 3-9, Jan 2017.

WEN, Z.; SONG, H.; MING, G. L. How does Zika virus cause microcephaly?. **Genes Dev.** v. 31, n. 9, p. 849-861, May 2017.

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation and phylogeny. **Proc Natl Acad Sci**, v. 83, n. 5, p. 1388-92, Mar 1986.

WEST-EBERHARD, M. J. Developmental plasticity and evolution. New York, NY: **Oxford University Press**, 2003.

WHO/CDC/ICBDSR. Birth defects surveillance: a manual for programme managers. Geneva: World Health Organization; 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/110223/9789241548724_eng.pdf;jsessionid=3E106EFBC471A6AEE6C275A1FAFC9A01?sequence=1>

WINICK, M.; ROSSO, P. The effect of severe early malnutrition on cellular growth of human brain. **Pediatr Res**, v. 3, n. 2, p. 181-4, Mar 1969.

WISE, G. E.; KING, G. J. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. **J Dent Res**, v. 87, n. 5, p. 414-34, May 2008.

WOODS, C. G.; PARKER, A. Investigating microcephaly. **Arch. Dis. Child**, v. 98, n. 9, p. 707-13, Sep 2013.

WUTZ, A.; GRIBNAU, J. X inactivation Xplained. **Curr Opin Genet Dev**, v. 17, n. 5, p. 387-93, Oct 2007.

YEARGIN-ALLSOPP, M. *et al.* Prevalence of cerebral palsy in 8-year-old children in three areas of the United States in 2002: a multisite collaboration. **Pediatrics**, v. 121, n. 3, p. 547-54, Mar 2008.

YOUNG, R. S. N. Behavioral effects of dietary neurotransmitter precursors: basic and clinical aspects. **Neurosci & Biobehav Rev**, v. 20, p. 313– 323, Summer 1996.

YOUNG, R. W. The influence of cranial contents on postnatal growth of the skull in the rat. **Am J Anat**, v. 105, p. 383-415, Nov 1959.

ZHANG, W. Q. *et al.* Acute dietary tryptophan manipulation differentially alters social behavior, brain serotonin and plasma corticosterone in three inbred mouse strains. **Neuropharmacology**, v. 90, p. 1-8, Mar 2015.

ANEXO A – PARECER Nº 0003/2017 CEUA – UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: (55 81) 2126 8840 / 2126 8355

Fax: (55 81) 2126 8350
 www.ocb.ufpe.br

Recife, 07 de junho de 2017.

Ofício nº 40/17

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 0003/2017

Certificamos que a proposta intitulada “Pode o tratamento neonatal com L-triptofano reverter danos estruturais craniofaciais e encefálicos em ratos microcefálicos?”, registrada com o nº 0003/2017, sob a responsabilidade de Prof. **Raul Manhães de Castro**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE).

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 12/2018
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus/ratos linhagem Wistar
Nº de animais	205
Peso/idade	220g-250g/ 90-120 dias
Sexo	Machos (100) e fêmeas (105)
Origem	Biotério do Departamento de Nutrição – CCS/UFPE

Atenciosamente,