



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

**DIEGO CABRAL LACERDA**

**EFEITO DO TRATAMENTO NEONATAL COM L-TRIPTOFANO SOBRE O  
PADRÃO SENSÓRIO-MOTOR DA MASTIGAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS A  
MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL**

Recife

2019

DIEGO CABRAL LACERDA

**EFEITO DO TRATAMENTO NEONATAL COM L-TRIPTOFANO SOBRE O  
PADRÃO SENSÓRIO-MOTOR DA MASTIGAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS A  
MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL**

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

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

**Orientador (a):** Dr. Raul Manhães de Castro

**Co-Orientadores:** Dra. Ana Elisa Toscano, Dra. Kelli Nogueira Ferraz-Pereira Althoff

Recife

2019

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

L131e Lacerda, Diego Cabral  
Efeito do tratamento neonatal com L-triptofano sobre o padrão sensório-motor da mastigação em ratos submetidos a modelo experimental de paralisia cerebral/ Diego Cabral Lacerda. – 2019. 103 f.; il.

Orientador: Raul Manhães de Castro.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Nutrição. Recife, 2019.  
Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Paralisia Cerebral. 2. Triptofano. 3. Mastigação. 4. Músculo Masseter. I. Castro, Raul Manhães de (orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2019 - 238)

DIEGO CABRAL LACERDA

**EFEITO DO TRATAMENTO NEONATAL COM L-TRIPTOFANO SOBRE O  
PADRÃO SENSÓRIO-MOTOR DA MASTIGAÇÃO EM RATOS SUBMETIDOS A  
MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL**

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

Aprovada em: 23/09/2019.

**Banca Examinadora:**

---

Dra. Sandra Lopes de Souza (Departamento de Anatomia, UFPE)

---

Dra. Matilde Cesiana de Silva (Centro Acadêmico de Vitória, UFPE)

---

Dra. Dayane Aparecida Gomes (Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFPE)

---

Dra. Kelli Nogueira Ferraz-Pereira Althoff (Centro Acadêmico de Vitória, UFPE)

---

Dra. Daniella Araújo de Oliveira (Departamento de Fisioterapia, UFPE)

Dedico este trabalho a Gisele Cabral Lacerda e Ana Maria Cabral de Lima, as duas mulheres mais importantes da minha vida, minhas fortalezas.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço acima de tudo a **DEUS** por sempre está comigo me acompanhando e me dando forças para conquistar meus objetivos. Nos momentos mais árduos, foi a ELE quem recorri para poder continuar seguindo em frente. Aos meus pais, **Ana Maria Cabral de Souza** e **Robson Lacerda de Lima**, por todo o incentivo para que eu pudesse realizar as metas que tanto almejei na minha vida. Sem o esforço e empenho deles, não seria possível alcança-las. À minha irmã, **Gisele Cabral Lacerda**, que sempre esteve comigo me apoiando em todos os momentos da minha vida. Aos meus amigos do grupo de pesquisa da UFPE, **Barbara Juacy**, **Henrique Gouveia**, **Manuella da Luz**, **Paula Brielle**, **Tassia Karin**, meu muito obrigado pela amizade, suporte e companheirismo durante toda essa jornada. Foram muitas risadas e bons momentos juntos, que tornaram meu cotidiano mais feliz, leve e positivo. Às estudantes de iniciação científica, **Mirelly De Jesus** e **Maria Clara**, pelo empenho para realização de várias atividades da pesquisa. Aos meus colegas da Aix Marseille Université, **Nejada Dingu**, **Nina Jurcic**, **Irénée Sanchez**, **Marine Kochman**, sou muito grato pela amizade e por todo apoio que recebi durante o período que estive na França. Aos meus **MELHORES** amigos, **Jean Sibellius**, **Fábio Nogueira**, **Rodrigo Félix** e **Bruno Sabino**, **Hareldo Pessoa**. Sei que pode passar o tempo que for, nossa amizade sempre prevalecerá. Às minhas grandes e eternas amigas de faculdade, **Luana Telles**, **Vivianne Bastos**, **Erika Oliveira**, **Leandra Ferraz**, que não deixam a distância diminuir nossa amizade! A **Angelita Marques** e **Monica Maria Gonçalves**, obrigado pelo carinho, afeto e amor que as duas tem por mim. Ao veterinário do Departamento de Nutrição, **Dr. Edeones França**, obrigado pela grande contribuição e suporte com a obtenção e criação dos animais. A **Josep Luis Pares Canadell**, obrigado pelo seu amor e por ter me acompanhado e me dado forças em momentos difíceis. Sou muito grato e feliz por ter lhe conhecido! À grande contribuição da minha

có-orientadora, **Profª Drª Kelli Nogueira**, que foi peça chave nessa pesquisa. Agradeço pela sua amizade e contribuição para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa. Me espelho em você como profissional! A **Dr. Jacques Olivier Coq**, obrigado por todos os ensinamentos e apoio durante o período que estive em Marseille. À minha professora orientadora, **Profª Drª Ana Elisa Toscano**, agradeço por sempre ter confiado e investido na minha carreira profissional desde o primeiro momento que ingressei no grupo de pesquisa. Ao meu professor orientador, **Prof. Dr. Raul Manhães de Castro**, meu muito obrigado por ter acreditado em mim. Obrigado também pelo seu acolhimento, cuidado, conselhos, pela sua sensibilidade e sexto sentido apurado durante todo período do doutorado. Aos **docentes da Pós-graduação em Nutrição**, pelo conhecimento que nos foi transmitido. Ao **Departamento de Nutrição**, pela estrutura e apoio para a realização do projeto. Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)**, pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Comumente crianças com paralisia cerebral (PC) apresentam dificuldades na alimentação resultantes de problemas na mastigação. Este estudo investigou o potencial terapêutico do Triptofano (TRI) em reduzir os problemas na mastigação em ratos submetidos a modelo experimental de PC. Um total de 80 ratos foram utilizados. Os filhotes foram randomicamente distribuídos nos seguintes grupos experimentais: Controle Salina, Controle TRI, PC Salina e PC TRI. O modelo experimental de PC consistiu na combinação da anóxia perinatal associado a restrição sensório-motora das patas posteriores. O TRI foi administrado via subcutânea durante o período de lactação. Parâmetros anatômicos e comportamentais foram avaliados durante as primeiras semanas de vida pós-natal, incluindo: peso corporal, consumo alimentar, sensibilidade intra-oral, movimentos mastigatórios, peso relativo e distribuição dos tipos de fibras do músculo masseter. A indução da PC limitou o ganho de peso corporal, reduziu o consumo alimentar e promoveu prejuízos morfológicos e funcionais em parâmetros da mastigação. Além disso, o tratamento com TRI aumentou o número de movimentos mastigatórios, a duração das reações de gosto, o peso relativo e a proporção de fibras IIB do músculo masseter em ratos submetidos a PC. Esses resultados demonstram que a indução da PC levou a prejuízos no desenvolvimento da mastigação e a suplementação com TRI contribuiu para maturação da mastigação em animais submetidos a PC.

**Palavras-Chave:** Paralisia Cerebral. Triptofano. Mastigação. Músculo Masseter.

## **ABSTRACT**

Children with cerebral palsy (CP) often exhibit difficulties in feeding resulting from deficits in chewing. This study investigates the therapeutic potential of L-tryptophan (TRI) to reduce deficits in chewing in rats subjected to an experimental model of CP. A total of 80 Wistar albino rats were used. Pups were randomly assigned to 4 experimental groups: Control Saline, Control TRI, CP Saline, and CP TRI groups. The experimental model of CP was based on the combination of perinatal anoxia associated with postnatal sensorimotor restriction of the hind limbs. TRI was administered subcutaneously during the lactation period. Anatomical and behavioral parameters were evaluated during maturation, including body weight gain, food intake, chewing movements, relative weight and the distribution of the types of masseter muscle fibers. The induction of CP limited body weight gain, decreased food intake and led to impairment in the morphological and functional parameters of chewing. Moreover, for a comparable amount of food ingested, CP TRI animals grew the most. In addition, supplementation with TRI improved the number of chewing movements, and increased the weight and proportion of type IIB fibers of the masseter in rats subjected to CP. These results demonstrate that experimental CP impaired the development of mastication and that TRI supplementation increased masticatory maturation in animals subjected to CP.

**Keywords:** Cerebral Palsy. Tryptophan. Mastication. Masseter Muscle.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Anóxia Perinatal
ATM	Articulação Têmporo Mandibular
BHE	Barreira Hematoencefálica
CPG	Centro de Padrão Gerador
DO	Disfagia Orofaringeal
EPM	Erro Padrão de Média
HI	Hipóxia-isquemia
ICP	Injúria Cerebral Perinatal
MAO	Enzima Monoaminoxidase
NMT	Motoneurônios trigeminais
Nvmot	Núcleo Motor Trigeminal
NVII	Nervo Facial
Nvsnpq	Núcleo Sensorial Principal do Trigêmeo
Nvmes	Núcleo Mesencefálico Trigemina
PC	Paralisia Cerebral
PCA	Análise dos Componentes Principais
RSM	Restrição Sensório-motora
SERT	Transportador de Serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
S1	Córtex Somatossensorial Primário
TRI	Triptofano
5-HT	Serotonina
5-HTP	5-hidroxitriptofano
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1</b>	<b>Plasticidade Fenotípica.....</b>	<b>17</b>
<b>3.2</b>	<b>Paralisia Cerebral.....</b>	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Paralisia Cerebral e dificuldades na alimentação.....</b>	<b>22</b>
<b>3.4</b>	<b>Modelos experimentais de Paralisia Cerebral.....</b>	<b>25</b>
<b>3.5</b>	<b>Avaliação do padrão sensorial e motor da mastigação.....</b>	<b>27</b>
<b>3.6</b>	<b>Serotonina e Triptofano.....</b>	<b>32</b>
<b>3.7</b>	<b>Análise do impacto da Paralisia Cerebral sobre o sistema serotoninérgico e possível efeito do triptofano sobre a mastigação em animais deficientes.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1</b>	<b>Animais.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2</b>	<b>Grupos Experimentais.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Modelo Experimental de Paralisia Cerebral.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4</b>	<b>Análises Experimentais.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.1</b>	<b>PESO CORPORAL.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.2</b>	<b>AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.3</b>	<b>AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS MOTORES DA MASTIGAÇÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.4</b>	<b>AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE INTRA-ORAL.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4.5</b>	<b>ANÁLISE DO FENÓTIPO DO MÚSCULO MASSETER.....</b>	<b>42</b>
<b>4.5</b>	<b>Análise Estatística.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Peso Corporal.....</b>	<b>44</b>

<b>5.2</b>	<b>Consumo Alimentar.....</b>	<b>44</b>
<b>5.3</b>	<b>Parâmetros motores da mastigação.....</b>	<b>45</b>
<b>5.4</b>	<b>Sensibilidade intra-oral.....</b>	<b>46</b>
<b>5.5</b>	<b>Fenótipo do músculo masseter.....</b>	<b>46</b>
<b>5.6</b>	<b>Relações Funcionais entre Variáveis Específicas usando PCA .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>6.1</b>	<b>Peso corporal.....</b>	<b>54</b>
<b>6.2</b>	<b>Consumo alimentar.....</b>	<b>55</b>
<b>6.3</b>	<b>Parâmetros motores da mastigação.....</b>	<b>56</b>
<b>6.4</b>	<b>Sensibilidade intra-oral.....</b>	<b>58</b>
<b>6.5</b>	<b>Fenótipo do músculo masseter.....</b>	<b>59</b>
<b>6.6</b>	<b>Relações Funcionais entre Variáveis Específicas Funcionais e Morfológicas.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>APÊNDICE A–ARTIGO ORIGINAL (NUTRITIONAL NEUROSCIENCE).....</b>	<b>72</b>
	<b>ANEXO A– APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CCB-UFPE).....</b>	<b>103</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A Paralisia Cerebral (PC) é considerada um grupo de desordens permanentes do movimento, postura e tônus muscular, causando limitações nas atividades de vida diária (ANDREW *et al.*, 2015). Este distúrbio nervoso é causado por uma lesão que se manifesta durante o desenvolvimento cerebral (KRIGGER, 2006). Comumente crianças com PC apresentam dificuldades na alimentação, o que resulta em desnutrição e pior prognóstico deste distúrbio (SULLIVAN, 2013). Neste contexto, cerca de 64% das crianças acometidas pela PC apresentam dificuldades na alimentação devido a múltiplos fatores físicos, cognitivos e emocionais (ANDREW; PARR & SULLIVAN, 2012). Entre os fatores físicos, estas crianças desenvolvem assimetrias corporais, inadequada postura ao sentar e pobre função manual, o que limita a aquisição e condução do alimento para a boca (SANGERMANO *et al.*, 2014). Além dessas anormalidades físicas, as dificuldades na alimentação também são resultantes de disfunções orofaciais (BENFER *et al.*, 2014).

As disfunções orofaciais compreendem variados déficits, incluindo prejuízos na sucção, mastigação, salivação, deglutição, movimentos faríngeais e esofágicos (BENFER *et al.*, 2014). Entre os problemas na mastigação observados em crianças acometidas pela PC, destacam-se: instabilidade dos movimentos mandibulares, dificuldades de reter o alimento na boca, o que leva a perda excessiva de alimento para fora da cavidade oral (BENFER *et al.*, 2014). Além disso, crianças com PC apresentam fraqueza e atrofia dos músculos da mastigação (BOTTI *et al.*, 2015). A redução na força desses músculos limita a eficiência da mastigação em triturar e pulverizar o alimento em pequenas partículas (BOTTI *et al.*, 2015). Ademais, a atípica co-ativação de músculos mastigatórios agonistas e antagonistas reduz a capacidade de processar o alimento na boca, bem como formação do bolo alimentar (BRIESEMEISTER; SCHMIDT & RIES, 2013). Portanto, em virtude das dificuldades

na alimentação, em destaque os problemas na mastigação, os períodos das refeições costumam ser prolongados, dolorosos e estressantes, gerando frustrações para os pais e sobretudo para as crianças com PC (SULLIVAN *et al.*, 2000).

Os movimentos rítmicos, como a sucção e mastigação são regulados por uma rede de neurônios localizados no tronco encefálico, que compreende os centros de padrão gerador (CPG) (KOLTA, A *et al.*, 2010). O CPG que regula os movimentos de sucção e mastigação se estende do polo rostral dos núcleos motores do nervo trigêmeo até o polo rostral do núcleo do nervo facial (KOLTA, A *et al.*, 2010). Ademais, evidências experimentais demonstraram que estes neurônios são modulados por sistemas de neurotransmissão, incluindo a serotonina (5-HT) (HSIAO *et al.*, 2002; KOLTAA; DUBUC R & LUND JP, 1993). Neste contexto, o sistema serotoninérgico é crucial para o controle da atividade dos motoneurônios trigeminais (MNT) (KOLTA A; DUBUC R & LUND JP, 1993). Os MNT recebem uma densa aferência de neurônios serotoninérgico, além de conter uma grande quantidade de receptores serotoninérgicos (KOLTA A; DUBUC R & LUND JP, 1993). Dessa forma, a atividade serotoninérgica aumenta a excitabilidade, facilitando a despolarização dos MNT (KURASAWA I; TODA K & NAKANURA Y, 1990). Além disso, a 5-HT participa da morfogênese das estruturas craniofaciais, incluindo: mandíbula, dentes, articulação têmporo-mandibular (ATM), língua e músculos da mastigação (MOISEIWITSCH, JR, 2000; BYRD KE & SHESKIN TA, 2001). Portanto, um intacto sistema serotoninérgico é necessário para maturação de estruturas envolvidas na mastigação.

O desenvolvimento do sistema serotoninérgico é comprometido após indução da PC experimental em animais (BULLER; WIXEY & REINEBRANT, 2012; REINEBRANT; WIXEY & BULLER, 2013). Modelos de PC baseado na hipóxia-isquemia, promoveu uma redução nos níveis cerebrais de 5-HT e diminuição na

quantidade e comprimento dos neurônios serotoninérgicos (WIXEY; REINEBRANT & BULLER, 2011). Além disso, o impacto no sistema serotoninérgico foi observado nas proximidades da área do CPG que regula os movimentos de sucção e mastigação (REINEBRANT, H *et al.*, 2010). Portanto o impacto sobre o sistema serotoninérgico parece desempenhar papel importante no aparecimento de déficits na mastigação (LACERDA, DC *et al.*, 2017)

Foi demonstrado em estudo prévio que a indução de PC a partir da anoxia perinatal (AP) associado a restrição sensório-motora (RSM) das patas posteriores, promoveu redução do peso corporal e do consumo alimentar, bem como déficits em parâmetros funcionais e morfológicos da mastigação (LACERDA, DC *et al.*, 2017). Portanto, este modelo reproduz achados clínicos típicos da PC, o que justifica sua replicação para investigar estratégias de tratamento em reduzir os danos na mastigação, a exemplo da manipulação da 5-HT (LACERDA, DC *et al.*, 2017).

A administração do aminoácido essencial Triptofano (TRI) tem sido amplamente utilizado em estudos experimentais para aumentar os níveis cerebrais de 5-HT (CONTREIRAS CARNEIRO *et al.*, 2018). A síntese do TRI envolve duas reações, uma de hidroxilação, onde o TRI é convertido em 5-Hidroxitriptofano e outra de descarboxilação, no qual o 5-Hidroxitriptofano é transformado em 5-HT (SILVA LUANA *et al.*, 2017). Evidências experimentais revelaram que a indução de PC promoveu mudanças no metabolismo do TRI, levando a ativação de micróglias e lesões excitotóxicas resultantes da produção de marcadores do estresse oxidativo (ZHANG, Z *et al.*, 2018; WILLIAMS, M *et al.*, 2017). De modo inverso, a suplementação com TRI reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias no córtex cerebral em animais submetidos a PC, o que demonstra seu papel neuroprotetor (DEL ANGEL-MEZA, AR *et al.*, 2011). Contudo, não é descrito na literatura os efeitos da

administração de TRI e aumento dos níveis de 5-HT no desenvolvimento dos movimentos mastigatórios e fenótipo dos músculos da mastigação, em modelo experimental de PC.

A hipótese deste estudo é que a suplementação com TRI aumenta os níveis cerebrais de 5-HT, o que restaura a atividade serotoninérgica no CPG da sucção e mastigação, levando ao aumento da quantidade e qualidade dos movimentos mastigatórios, em modelo experimental de PC. Para investigar nossa hipótese, foi analisado o efeito da administração do TRI, durante o período de lactação, sobre parâmetros funcionais e morfológicos da mastigação, em ratos submetidos a AP associado a RSM das patas posteriores. Achados encorajadores demonstraram que a manipulação do sistema serotoninérgico tem sido indicada como recurso terapêutico para tratamento de outros distúrbios nervosos, o que sugere a possibilidade de melhorias semelhantes na paralisia cerebral (PINTO *et al.*, 2017; BUDHDEO e RAJAPAKSA, 2011). Portanto, um possível aumento na atividade serotoninérgica, induzido pela terapia neonatal com o aminoácido precursor TRI, pode minimizar os danos na mastigação que se manifestam na PC.

## **2 OBJETIVOS**

**Objetivo Geral** Avaliar as repercussões precoce do tratamento neonatal com TRI sobre parâmetros sensório-motores, da mastigação, em ratos submetidos ao modelo experimental de PC.

### **Objetivos Específicos**

- Ganho de peso corporal dos filhotes;
- Consumo alimentar (Ingestão láctea – sucção, ingestão de fragmentos de ração - mastigação);
- Parâmetros motores da mastigação;
- Sensibilidade intra-oral;
- Fenótipo do músculo masseter – peso relativo e proporção dos diferentes tipos de fibras musculares.

### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Plasticidade Fenotípica**

O fenótipo de um indivíduo é a expressão última da interação do seu genótipo (conjunto de gens) e do ambiente (WEST-EBERHARD, 1986). O estabelecimento do fenótipo nos mamíferos tem na fase perinatal, um período vulnerável a múltiplos fatores ambientais (GLUCKMAN ; HANSON & BEEDLE, 2007). O período perinatal, composto sobretudo pelas fases iniciais da vida (gestação e lactação), é considerado crítico para o crescimento e desenvolvimento dos mamíferos (GLUCKMAN ; HANSON & BEEDLE, 2007). São momentos específicos da vida em que o organismo sofre modificações estruturais e fisiológicas importantes, para a formação dos órgãos e tecidos (MORGANE ; MOKLER & GALLER, 2002).

Evidências epidemiológicas e experimentais demonstraram que variações ambientais quando incidem sobre o período perinatal, podem levar a mudanças fenotípicas com repercussões permanentes no metabolismo, estrutura e função dos sistemas fisiológicos (HALES, 1997; MORGANE ; MOKLER & GALLER, 2002). Neste contexto, o fenômeno biológico na qual o organismo é capaz de reagir aos desafios impostos pelo ambiente modificando a sua forma, estado, movimento ou padrão de atividade, é chamado de plasticidade fenotípica (WEST-EBERHARD, 1986). Portanto, a plasticidade fenotípica permite que uma variação de fenótipos possam ser expressos por um único genótipo, a depender da particular interação do organismo com o meio ambiente (GLUCKMAN ; HANSON & BEEDLE, 2007).

Uma das variações mais bem documentadas no estudo da plasticidade fenotípica são os fatores nutricionais (DE MOURA ; LISBOA & PASSOS, 2008). Um suprimento adequado de nutrientes é fundamental para o crescimento e desenvolvimento em todos os sistemas biológicos (MORGANE, 1993). Nesse contexto, a nutrição materna interfere sobre o crescimento e desenvolvimento fetal

(BLACK, 1999). A falta ou o aumento do aporte nutricional durante períodos críticos do desenvolvimento podem resultar em alterações permanentes na estrutura e função de órgãos (OZANNE, HALES, 2004). Associado a isso, a restrição neonatal de proteína materna está relacionada com um menor estoque de nutrientes maternos e, subsequentemente, menor transferência de nutrientes para os filhotes, o que está relacionado ao decréscimo do crescimento pós natal (HALLAL *et al.*, 2012). Assim, a quantidade e a qualidade do aporte nutricional durante os períodos críticos do desenvolvimento pode ter consequências permanentes para a vida das pessoas afetadas (HALLAL *et al.*, 2012). Além disso, o sistema nervoso é considerado particularmente vulnerável a agressões nutricionais, sobretudo durante o período perinatal (MORGANE ; MOKLER & GALLER, 2002).

O pobre estado nutricional, durante as fases iniciais da vida, pode levar ao desenvolvimento da injúria cerebral perinatal (ICP) (ANDREW; PARR & SULLIVAN, 2012). A ICP é caracterizada pela diminuição do crescimento cerebral e prejuízo sobre as funções reguladas pelo sistema nervoso (SULLIVAN, 2000). Além disso, a lesão cerebral promovida pela má nutrição compromete o desenvolvimento das funções motoras, cognitivas, resultando em anormalidades comportamentais (KUPERMINC & STEVENSON, 2008). Dessa forma, a ICP pode levar ao aparecimento de distúrbios nervosos, como a Paralisia Cerebral (PC) (ANDREW; PARR & SULLIVAN, 2012). Assim, o pobre estado nutricional compõe um dos efeitos primários da lesão cerebral em crianças acometidas pela PC (ANDREW; PARR & SULLIVAN, 2012). Além disso, evidências epidemiológicas revelam que a desnutrição pode exacerbar lesões que incidem sobre o sistema nervoso (SULLIVAN 2000). Portanto, fica evidente que modificações ambientais durante o período perinatal, como por exemplo a má nutrição, pode resultar em atraso do desenvolvimento do sistema

nervoso e dar origem a sequelas neurológicas permanentes e incapacitantes, como a PC

### **3.2 Paralisia Cerebral**

A PC é considerada um grupo de desordens permanentes do movimento, postura e tônus muscular, causando limitações nas atividades de vida diária (ANDREW *et al.*, 2015). Este distúrbio nervoso é provocado por uma lesão não progressiva e estática que acomete o cérebro fetal em desenvolvimento (KRIGGER, 2006). Em virtude do desenvolvimento cerebral se prolongar durante os primeiros dois anos de vida, a PC pode ser resultante de uma lesão cerebral durante os períodos pré-natal, no momento do parto ou durante os primeiros dois anos de vida pós-natal (KRIGGER, 2006). Comumente as alterações motoras são acompanhadas de distúrbios na sensação, percepção, cognição, comunicação, comportamento, além de problemas secundários musculoesqueléticos (COLVER; FAIRHURST & PHAROAH, 2014).

A prevalência da PC mundialmente é estimada em 2.11 por 1000 nascidos vivos. Contudo a prevalência em crianças pré-maturas com peso inferior a 1,500g é cerca de 59.18 entre 1000 nascimentos (KOMAN; SMITH; SHILT & 2004). No Brasil, estima-se que a cada 1.000 crianças nascidas vivas, sete são portadoras de PC, e que cerca de 30.000 a 40.000 novos casos ocorrem por ano (MANCINI *et al.*, 2002). 70 a 80% dos casos são oriundos durante o período pré-natal (KRIGGER, 2006). Os principais fatores de risco que incidem durante o período pré-natal são: pré-maturidade, baixo peso ao nascer, retardo do crescimento fetal intrauterino, hemorragia intracranial e trauma (KOMAN; SMITH; SHILT & 2004; KRIGGER, 2006). Complicações no parto, incluindo asfixia, configuram 6 a 10% dos casos (BAX *et al.*, 2005). 10 a 20% dos casos são devidos a causas pós-natais, entre elas dano cerebral ocasionado pela meningite bacteriana, encefalite viral, hiperbilirrubinemia e quedas (KRIGGER, 2006).

A ICP varia de acordo com o tempo, local e extensão do insulto (COLVER; FAIRHURST & PHAROAH, 2014). Insultos que ocorrem durante o primeiro semestre são relacionados em muitos casos a esquizofrenia (COLVER; FAIRHURST & PHAROAH, 2014). Quando a lesão incide durante o segundo trimestre, comumente se manifesta leucomalácia periventricular (COLVER; FAIRHURST & PHAROAH, 2014). Por fim, quando a lesão cerebral se instala durante o terceiro trimestre, ocasiona dano na substância cinzenta cortical (COLVER; FAIRHURST & PHAROAH, 2014). Quando a lesão cerebral se manifesta no córtex cerebral, a injúria dos motoneurônios superiores reduz os impulsos corticais enviados aos tractos reticuloespinal e corticoespinal (KOMAN; SMITH; SHILT & 2004). Em consequência, este impacto prejudica o controle motor, reduz o número de unidades motoras efetivas, produzindo atrofia e fraqueza muscular, além de anormalidades no controle muscular (GOLDSTEIN, 2001; KOMAN; SMITH; SHILT & 2004). Além disso, a redução nos impulsos descendentes corticais, aumenta a excitabilidade dos motoneurônios alfa e gama, produzindo espasticidade (GOLDSTEIN, 2001).

A maioria dos indivíduos acometidos pela PC desenvolvem espasticidade, definida como aumento da resistência muscular ao alongamento velocidade – dependente (FLETT, 2003). A espasticidade pode levar a complicações musculoesqueléticas, tais como contraturas musculares, aumento da sensibilidade dolorosa, bem como alterações na locomoção, caracterizada por marcha em tesoura e contato com o solo usando os dedos dos pés (KRIGGER, 2006). Em menor frequência, quando a injúria cerebral ocorre no sistema extrapiramidal ou cerebelo, resulta em desordens na coordenação e destreza dos movimento, tais como atetose, corea, distonia ou rigidez (KOMAN; SMITH; SHILT & 2004). Além disso, as manifestações clínicas da PC podem ser classificadas de acordo com a topografia,

incluindo diplegia, hemiplegia e quadriplegia (SANGER *et al.*, 2003). A diplegia, comumente associada a leucomalácia periventricular, é caracterizada por grave envolvimento dos membros inferiores e em menor grau nos membros superiores (KOMAN; SMITH; SHILT & 2004). A hemiplegia, resultante de uma injúria em um dos hemisférios cerebrais, é caracterizada por envolvimento de membros superiores e inferiores de um lado do corpo (FEDRIZZI *et al.*, 2003). Por fim, a quadriplegia, decorrente de um insulto difuso do SNC é definida pelo envolvimento concomitante dos membros superiores e inferiores (KOMAN; SMITH; SHILT & 2004).

Além do impacto sobre o tônus muscular, postura e movimentos, a PC engloba comorbidades que limitam as atividades de vida diária, e levam a dependência funcional (BAX *et al.*, 2005). Entre as principais comorbidades, destacam-se os prejuízos cognitivos e intelectuais, observados em cerca de dois terços dos indivíduos com PC (BENFER *et al.*, 2015). Comprometimentos visuais, auditivos e na sensibilidade tátil também são frequentes (KRIGGER, 2006). Além disso, crianças com PC desenvolvem dificuldades na alimentação, que resultam em redução do consumo alimentar, desnutrição e a depender do grau de comprometimento, pior prognóstico da doença (SULLIVAN, 2013 ;BENFER *et al.*, 2017). Vale ressaltar também que a depender a gravidade das dificuldades motoras periféricas, como assimetrias corporais, pobre manualidade e alterações na mobilidade, estas anormalidades limitam a capacidade da criança em se alimentar de forma autônoma (SULLIVAN, 2013 ;BENFER *et al.*, 2017). Portanto, fica evidente que as funções motoras periféricas e orais se correlacionam, de modo que um comprometimento motor afeta de maneira generalizada as habilidades motoras necessárias para que a criança possa se alimentar sem dificuldades ou intercorrências.

### 3.3 Paralisia Cerebral e Dificuldades na Alimentação

Comumente crianças com PC apresentam dificuldades na alimentação, que resultam em um quadro de desnutrição, redução do crescimento corporal, bem como aumento da taxa de mortalidade (SULLIVAN, 2013). Achados epidemiológicos demonstram que cerca de 64% dessas crianças apresentam dificuldades na alimentação (BENFER *et al.*, 2014). Estas anormalidades usualmente são decorrentes de fatores cognitivos, emocionais e físicos (ANDREW; PARR & SULLIVAN, 2012). Entre os fatores cognitivos e emocionais, estas crianças apresentam falhas na comunicação e linguagem, o que limita a interação social e expressão do desejo de se alimentar bem como preferências alimentares (DAHLSENG *et al.*, 2012). No que se refere aos fatores físicos, a inadequada postura ao se alimentar, a cabeça posicionada fora da linha mediana, assimetrias corporais e pobre função manual, limita a aquisição e condução do alimento a boca (SANGERMANO *et al.*, 2014). Além dessas anormalidades físicas, o dano na capacidade na alimentação está relacionado sobretudo ao desenvolvimento da disfagia orofaríngea (OD) (BENFER *et al.*, 2014).

A DO compreende os prejuízos na preparação do alimento, transporte do bolo alimentar, deglutição e movimentos faríngeais e esofágicos para condução do alimento ao estômago (ANDREW; PARR & SULLIVAN, 2012). Esses danos podem comprometer as quatro etapas da deglutição: fase antecipatória, fase oral, fase faríngea e fase esofágica (BENFER *et al.*, 2014). Inicialmente, a fase antecipatória é comprometida pela incapacidade da criança em utilizar de forma coordenada os membros superiores para adquirir o alimento, utilizando utensílios (garfo, faca, colher) e conduzi-lo até a boca (BENFER *et al.*, 2012). O prejuízo na visão e olfato, acompanhado do desalinhamento do pescoço e cabeça, limitam a capacidade da criança em guiar o alimento até o interior da cavidade oral, sem deixar cair (BENFER *et al.*, 2012). Em seguida, a fase oral é marcada pela inabilidade da criança em

preparar o alimento no interior da cavidade oral (BENFER *et al.*, 2014). Esta fase é marcada por prejuízos sensoriais e motores, incluindo redução da sensibilidade intra-oral, comprometimento dos movimentos mastigatórios e da língua, bem como redução na produção da saliva (BENFER *et al.*, 2015). O dano na sensibilidade intra-oral é caracterizado por falhas na detecção dos sabores e prazer ao ingerir um alimento considerado palatável (BENFER *et al.*, 2012; SCHIFFMAN *et al.*, 2007). Quanto ao impacto na função lingual, as protrusões exageradas, alterações no tônus muscular lingual, limitação da lateralização da língua, prejudicam a manipulação do alimento na cavidade oral (BENFER *et al.*, 2015). Ademais, impulsos repetitivos da língua, contribuem para perda do alimento para o meio externo (BENFER *et al.*, 2014). A perda do alimento também pode ocorrer em função do velamento labial incompleto, o que propicia o derramamento de alimentos sólidos e líquidos, além da saliva (BENFER *et al.*, 2014). A redução na produção da saliva, por sua vez, reduz a lubrificação do alimento e dificulta a realização dos movimentos mastigatórios (BENFER *et al.*, 2014).

Os problemas na mastigação são resultantes de movimentos mandibulares não coordenados, instabilidade da mandíbula, dificuldades de abrir e fechar a mandíbula de maneira coordenada, mordidas irregulares, além de prejuízos funcionais e músculos da mastigação (SEREL *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2012). Entre as anormalidades na função muscular, destaca-se a fraqueza e atrofia dos músculos mastigatórios (BOTTI *et al.*, 2015). A redução na força desses músculos, limita a capacidade oral de triturar o alimento em pequenas partículas (BOTTI *et al.*, 2015). Além disso, a atípica co-ativação de músculos mastigatórios agonistas e antagonistas, reduz a capacidade de pulverizar o alimento no interior da cavidade oral (BRIESEMEISTER; SCHMIDT & RIES, 2013). Ademais, a hipertonia dos músculos oclusores da mandíbula limita a realização de movimentos mastigatórios de maneira

coordenada (ORTEGA *et al.*, 2008). Em consequência, os danos na mastigação reduzem a capacidade de trituração e pulverização do alimento em micro partículas, para formação de um bolo alimentar adequado para deglutição (BENFER *et al.*, 2014).

O atraso na iniciação do reflexo de deglutição, limita a fase faríngea da deglutição, e predispõe a criança com PC aspirar o bolo alimentar para as vias aéreas (BENFER *et al.*, 2014). O comprometimento na fase faríngea da deglutição ocorre em função da proteção inadequada das vias aéreas, durante a deglutição, o que propicia a passagem do bolo alimentar para a traqueia (ADAMS *et al.*, 2012). Neste sentido, a aspiração crônica de alimentos e fluídos para as vias aéreas, é considerado importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças pulmonares, como a pneumonia, fibrose pulmonar e bronquiectasia (ARVEDSON *et al.*, 2013). Outro agravante é que crianças com PC apresentam aspiração de forma silenciosa, em função do prejuízo no mecanismo da tosse (reflexo da tosse) essencial para proteção das vias aéreas (ARVEDSON *et al.*, 2013).

Ademais, crianças com PC apresentam falhas na função esofágica da deglutição, em virtude da lentificação do transito do bolo alimentar no esôfago, redução do peristaltismo esofágico e desenvolvimento do refluxo gastroesofágico (BENFER *et al.*, 2014). O impacto sobre as funções gastrointestinais reflete a falha na conexão entre o SNC e bilhões de neurônios que compõem o sistema nervoso entérico (BENFER *et al.*, 2014). Em razão dessas anormalidades que compreendem a DO, comumente os períodos das refeições se tornam prolongados, dolorosos e estressantes, gerando frustrações para os pais ou responsáveis e sobretudo para as crianças acometidas pela PC (SULLIVAN *et al.*, 2000). Contudo, a escassez de evidências experimentais que poderiam esclarecer os mecanismos subjacentes às

dificuldades na alimentação, limita a eficácia de intervenções terapêuticas disponíveis a estas crianças.

### **3.4 Modelos Experimentais de Paralisia Cerebral**

Estudos experimentais que simulam a PC em animais, tem contribuído sobremaneira no esclarecimento dos mecanismos subjacentes as disfunções sensoriais e motoras característicos deste distúrbio nervoso (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017; SILVA, K.O.G *et al.*, 2016). Dessa forma, estes modelos são ferramentas importantes para elucidação de tais mecanismos e visam extrapolação desses dados para humanos, afim de contribuir com a eficácia das estratégias de tratamento oferecidas a indivíduos acometidos por esta síndrome (SILVA, K.O.G *et al.*, 2016).

A indução da PC é realizada em animais durante a gestação, durante o parto ou nos primeiros dias de vida pós-natal (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017). Os modelos de PC induzidos na gestação, são obtidos a partir de um insulto materno e consequente dano no cérebro dos filhotes (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017). Entretanto, os modelos induzidos durante o parto ou nos primeiros dias de vida pós-natal, o dano é provocado diretamente nos filhotes (JOHNSTON, M.V *et al.*, 2005).

Quanto ao método de indução da PC, a inflamação materna intrauterina promove substancial ativação das micróglia no cérebro da prole, o que mimetiza uma característica histopatológica da PC em humanos (DERRICK, M *et al.*, 2007). Em relação aos modelos replicados a partir da hipóxia-isquemia (HI), as fêmeas gestantes são submetidas a isquemia uterina, com o objetivo de simular a insuficiência placentária em neonatos pré-maturos (DROBYSHEVSKY, A *et al.*, 2006). Este modelo causa hipóxia global fetal, acompanhado de redução imediata do fluxo sanguíneo cerebral dos filhotes, o que resulta em dano cerebral (DROBYSHEVSKY, A *et al.*, 2006).

Os modelos experimentais de PC replicam uma ou mais características clínicas desta síndrome em animais (JOHNSTON, M.V *et al.*, 2005). Quanto ao tipo predominante, os modelos experimentais simulam a PC espástica, com acometimento do tônus muscular dos membros posteriores ou dos quatro membros dos animais (DERRICK, M *et al.*, 2007). Ademais, estes modelos são capazes de replicar alguns danos que compõem a DO, e que são típicos da PC. Os seguintes danos orofaciais em modelos experimentais de PC foram descritos na literatura: falha no alcance e aquisição do alimento (CHEN, A. *et al.*, 2008) , redução dos movimentos da cabeça durante alimentação, (TAN *et al.*, 2005) comprometimento da resposta olfatória (DROBYSHEVSKY, A *et al.*, 2006), prejuízos morfológicos nos músculos da mastigação (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017) e redução na coordenação da sucção e deglutição (DERRICK, M *et al.*, 2007).

Os modelos experimentais utilizados para reprodução dos danos que compreendem a DO são resultante de um dano provocado no cérebro, durante o período perinatal (DERRICK, M *et al.*, 2007; DROBYSHEVSKY, A *et al.*, 2006). No entanto, os modelos experimentais baseados em um único insulto, parecem não ser eficazes em reproduzir em sua totalidade o fenótipo típico da criança com PC (SILVA, K.O.G *et al.*, 2016; COQ, J.O. *et al.*, 2008). Modelos experimentais induzidos por combinação de insultos, conseguem mimetizar mais características da doença (COQ, J.O. *et al.*, 2008). Diante disso, o modelo proposto por Coq e colaboradores que consiste na combinação da anóxia perinatal (AP) associado à restrição sensório-motora (RSM) das patas posteriores, reproduz diversas anormalidades na atividade locomotora, coordenação, equilíbrio, além de atrasos nos marcos do desenvolvimento motor (COQ, J.O. *et al.*, 2008). Portanto, este modelo reproduz uma ampla variedade de características clínicas típicas do fenótipo da PC (COQ, J.O. *et al.*, 2008; STRATA,

F. *et al.*, 2004) , o que justifica sua replicação para elucidação das manifestações clínicas desta síndrome.

Quanto aos parâmetros avaliados em modelo de AP associado à RSM, a maior parte dos estudos que investigam este modelo buscam investigar os mecanismos subjacentes aos achados neurológicos e modificações na atividade locomotora (SILVA , K.O.G *et al.*, 2016; COQ, J.O. *et al.*, 2008). No entanto, há uma escassez de estudos na literatura que investiguem os processos relacionados ao comportamento alimentar e às funções orofaciais. Nesse sentido, é importante entender o impacto deste modelo sobre funções orofaciais, haja vista que estudos mostram efeitos deletérios na histologia do músculo esquelético e na organização do córtex somatossensorial primário (S1) (STIGGER *et al.*, 2011). Ademais, como a representação cortical da cavidade oral em S1 é extensa, supõe-se que este modelo seja capaz de replicar alterações que são típicas da DO. Em virtude da alta prevalência de problemas na mastigação na PC, surgiu o nosso interesse de investigar como esta função vital pode ser prejudicada em ratos submetidos a AP associado a RSM.

### **3.5 Avaliação do Padrão Sensorial e Motor da Mastigação**

A mastigação compreende uma série de processos mecânicos e enzimáticos, que permite a trituração do alimento e formação do bolo alimentar (KOLTA, A *et al.*, 2010). Este processo marca o início da digestão e atua como gatilho para a secreção de hormônios e enzimas digestivas (ZHU; HSU & HOLLIS, 2013). Além disso, a mastigação participa da ativação de cascatas neuroendócrinas que permitem digestão e sinalização da saciedade (ZHU; HSU & HOLLIS, 2013). Ademais, o ato de mastigar propicia estímulos mecânicos para a mandíbula, bem como articulação têmporo-mandibular (ATM), dentes, estimulando o crescimento e desenvolvimento orofacial (ISHIDA T; YABUSHITA T & ONO T, 2013). O estímulo mecânico resultante dos movimentos mastigatórios desempenha papel chave, sobretudo durante o período

pós-natal precoce, fase em que ocorre a transição da sucção para mastigação (WESTNEAT e HALL, 1992).

A nutrição dos mamíferos durante o período pós-natal precoce é representada pelo aleitamento materno (SMOTHERMAN e ROBINSON, 1994). Inicialmente os nutrientes e fluidos são obtidos pelo mamilo materno através do comportamento de sucção (WESTNEAT e HALL, 1992). Entretanto à medida que o animal se desenvolve, o comportamento de sucção é substituído gradativamente pela mastigação (WESTNEAT e HALL, 1992). Essa transição no comportamento alimentar reflete a maturação neuromuscular e funcional da mastigação que ocorre durante o período crítico do desenvolvimento, particularmente na gestação e lactação (BROCARD, F *et al.*, 2006). Em estudos experimentais foi observado em ratos, os primeiros movimentos mastigatórios e a ingestão de alimentos sólidos no décimo segundo dia de vida pós-natal (WESTNEAT e HALL, 1992). Porém o amadurecimento do padrão motor da mastigação é finalizado no vigésimo primeiro dia de vida pós-natal (P21) (WESTNEAT e HALL, 1992). Portanto a análise de parâmetros da mastigação em ratos no P21, têm sido uma estratégia eficaz em avaliar aspectos funcionais (motores e sensoriais) e morfológicos da mastigação.

Quanto aos parâmetros motores, a mastigação pode ser avaliada de acordo com o protocolo proposto por Ferraz-Pereira e colaboradores (FERRAZ-PEREIRA *et al.*, 2015). De acordo com este protocolo, os seguintes parâmetros motores podem ser avaliados: sequência da mastigação, duração do período de incisão, duração do período da mastigação rítmica e número de ciclos mastigatórios. O período de incisão é caracterizado por sucessivas incisões e da condução do alimento para a parte posterior da cavidade oral, quando se inicia o período da mastigação rítmica (FERRAZ-PEREIRA *et al.*, 2015). No período da mastigação rítmica iniciam-se os

ciclos mastigatórios, movimentos regulares de abrir e fechar a mandíbula, destinados a promover a trituração e pulverização do alimento (FERRAZ-PEREIRA *et al.*, 2015). Além disso, outro parâmetro analisado trata-se da frequência mastigatória, definido pela quantidade de ciclos mastigatórios executados durante o período de mastigação rítmica (LACERDA *et al.*, 2017). Portanto a análise desses parâmetros permite avaliar o grau da eficiência mastigatória, que consiste na capacidade da mastigação em triturar e pulverizar o alimento em micro-partículas para formação de um bolo alimentar adequado para deglutição (MOSTAFEEZUR *et al.*, 2012). Em virtude da PC ser marcada por variados comprometimentos motores da mastigação, nós investigamos como a indução da PC em ratos pode afetar o desenvolvimento destes parâmetros no P21. De acordo com nossos achados, ratos submetidos a PC apresentaram aumento na duração do período de incisão, redução no número de ciclos mastigatórios e declínio da frequência mastigatória (LACERDA *et al.*, 2017). Portanto a indução da PC reduziu a eficiência da mastigação, demonstrado a partir da quantificação de parâmetros motores da função mastigatória.

Além dos parâmetros motores da função mastigatória, comprometimentos sensoriais podem reduzir a habilidade da procura e apreciação do alimento, levando a inadequada ingestão de nutrientes (TOTH e POEHLMAN, 2000). Durante a alimentação, os receptores sensoriais intraorais, sobretudo as papilas gustativas situadas na superfície da língua, são ativados durante a execução dos movimentos mastigatórios (YAMADA; YAMAMURA & INOUE, 2005). Esses receptores estão envolvidos em fornecer o feedback sensorial ao cérebro e guiar os movimentos mastigatórios da mandíbula (YAMADA; YAMAMURA & INOUE, 2005). Nesse contexto, experimentos utilizando animais, têm ajudado a compreender as respostas provocadas por variados tipos de sabores dos alimentos (CHAO – YI HO e BERRIDGE,

2014). Esses experimentos analisam as expressões faciais e corporais de animais submetidos a diferentes estímulos do sabor (CHAO – YI HO e BERRIDGE, 2014). Como humanos e outros mamíferos, reagem de forma semelhante aos estímulos do sabor, o teste de reatividade intra-oral, aplicado em ratos, tem sido uma boa ferramenta na aquisição de dados potencialmente extrapoláveis para humanos (CHAO – YI HO e BERRIDGE, 2014).

A administração de soluções de “gosto”, como a sacarose, provocam respostas prazerosas para o animal, tais como, protrusões e movimentos laterais da língua e “lamber” as patas (CHAO – YI HO e BERRIDGE, 2014). Em virtude das crianças acometidas pela PC desenvolverem distúrbios na percepção do gosto dos alimentos, nós analisamos como a indução da PC em ratos pode afetar a sensibilidade intra-oral. Os animais submetidos a PC experimental foram menos responsivos ao receber um estímulo hedônico, promovido pela administração de uma solução doce, contendo sacarose (LACERDA et al., 2017). Além disso, é importante ressaltar que o papel da percepção do gosto dos alimentos, não se limita apenas em influenciar as preferências alimentares, seleção e iniciação da alimentação, como também desempenha papel importante sobre a integridade e funções do sistema digestivo (SCHIFFMAN *et al.*, 2007). Portanto, sugere-se que a redução da sensibilidade intra-oral em ratos submetidos a PC, pode prejudicar as cascatas de eventos que ocorre no sistema gastrointestinal.

O amadurecimento da mastigação possui uma evolução gradativa, depende do crescimento estrutural crânio-facial, constatado no tempo através do aumento do volume intra-oral, da irrupção dentária, aumento da mandíbula, maturação das articulações e dos músculos da mastigação (SHIBATA, 2010). A mastigação requer o funcionamento coordenado de cerca de vinte músculos orofaciais, em destaque o

músculo masseter (KOLTA, A *et al.*, 2010). Durante a mastigação, o músculo masseter é acionado para execução dos golpes mastigatórios, potentes movimentos de oclusão da mandíbula, afim de triturar e pulverizar o alimento e posterior formação do bolo alimentar (KAWAI *et al.*, 2009). Em razão do músculo masseter desempenhar papel crucial na mastigação, nós investigamos como este músculo pode ser comprometido em ratos submetidos a PC experimental. De acordo com nossos achados, a indução da PC promoveu redução do peso relativo, bem como mudanças na distribuição dos tipos de fibras musculares do músculo masseter (LACERDA *et al.*, 2017). Ratos submetidos a PC apresentaram aumento na proporção das fibras IIA associada a redução na proporção de fibras IIB (LACERDA *et al.*, 2017). As fibras IIB tem como característica serem recrutadas em movimentos explosivos, de força, potência e velocidade de contração muscular (KAWAI *et al.*, 2009). A menor proporção de fibras musculares do tipo IIB, observado nos animais submetidos a PC experimental, sugere redução na intensidade dos golpes mastigatórios, movimentos essenciais para triturar e pulverizar o alimento em micro-partículas (LACERDA *et al.*, 2017). Em suma, a indução da PC experimental em ratos levou a prejuízos em variados aspectos funcionais e morfológicos da mastigação (LACERDA *et al.*, 2017).

Quanto à regulação neural da função mastigatória, o padrão básico dos movimentos mandibulares são controlados pelo centro gerador de padrão (CPG), situado no tronco encefálico entre os núcleos motores trigeminal (NVmot) e facial (NVII) (KOLTA, A *et al.*, 2010). O complexo nuclear trigeminal, sobretudo o NVmot, sensorial principal (NVsnpr) e mesencefálico (NVmes) do nervo trigêmeo, exerce um papel essencial no controle e modulação da mastigação (BROCARD F; TAZERART S & VINAY L, 2010; KOLTA, A *et al.*, 2010). O NVmot contém motoneurônios somáticos que inervam os músculos da mandíbula (KOLTA, A *et al.*, 2010). O NVsnpr está

envolvida no controle do ritmo da mastigação (BROCARD F; TAZERART S & VINAY L, 2010) . O NVsnpr recebe estímulos da área mastigatória cortical e dos aferentes sensoriais trigeminais, e neurônios da sua parte dorsal projetam aos NVmot (BROCARD F; TAZERART S & VINAY L, 2010). Neste contexto, a maturação da mastigação envolve a participação de sistemas de neurotransmissão, em destaque a serotonina (5-HT) (KOLTAA; DUBUC R & LUND JP, 1993).

### **3.6 Serotonina e Triptofano**

A 5-HT é um neurotransmissor, cujo precursor é o aminoácido essencial Triptofano (TRI). No plasma sanguíneo, o TRI é encontrado parte ligado a proteína albumina, e a outra parte se mantém livre (RUDDICK *et al.*, 2006). O TRI é transportado para o cérebro a partir de transportadores situados nos capilares que compõem a barreira hematoencefálica (BHE). A fração do TRI conjugada a albumina não é capaz de atravessar a BHE, sendo apenas a fração livre disponível para penetrar esta barreira (RUDDICK *et al.*, 2006). Além disso, o transporte do TRI na BHE depende da competição entre os aminoácidos neutros (tirosina, fenilamina, leucina e isoleucina e valina)(HAIDER ; KHALIQ & HALEEM, 2007). Dessa forma, estudos revelam que o aumento da concentração do TRI favorece seu transporte para o cérebro em relação aos aminoácidos neutros(RUDDICK *et al.*, 2006; YOUNG, 2013). Após penetrar no sistema nervoso, o TRI é utilizado por várias células nervosas, incluindo os neurônios serotoninérgicos (CONTREIRAS CARNEIRO *et al.*, 2018). Os neurônios serotoninérgicos se originam nos núcleos da rafe, estão situados no tronco encefálico, e se distribuem para várias regiões do sistema nervoso, sobretudo o cerebelo, córtex frontal, hipotálamo e hipocampo (CONTREIRAS CARNEIRO *et al.*, 2018). Após a captação do TRI, sua metabolização segue um processo complexo que conduz à geração de vários compostos neuroativos, em destaque a 5-HT (CHEN, Yiquan e GUILLEMIN, 2009).

A síntese de 5-HT, tendo como TRI como precursor, envolve várias etapas. Inicialmente o TRI é hidroxilado e convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela ação da triptofano hidroxilase (SILVA LUANA *et al.*, 2017). A hidroxilação do TRI compreende a etapa limitante deste processo, o que ressalta a importância da enzima 5-HTP na síntese da 5-HT (YAO *et al.*, 2011). A 5-HTP é encontrada nos neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe, mas também nas células da glândula pineal, mastócitos, assim como nas células enterocromafins intestinais (MATEOS *et al.*, 2009). Portanto, a elevação dos níveis de TRI aumenta a síntese da 5-HT, não apenas pela ação de células nervosas, mas também pelas células do trato gastrointestinal (MATEOS *et al.*, 2009). Após a hidroxilação do TRI, o 5-HTP é descarboxilado, a partir da enzima 5- hidroxitriptofano descarboxilase, dando origem a 5-HT(SILVA e colab., 2017). Em seguida, a degradação da 5-HT é feita pelas enzimas monoaminoxidase (MAO) e aldeído desidrogenase (ALDH), tendo como produto final o ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (FERNSTROM, 1991). Contudo é importante ressaltar que o TRI também é utilizado em outras vias metabólicas, a exemplo da via das quinureninas, cujo produto final é a quinurenina (YAO *et al.*, 2011).

A 5-HT desempenha papel importante nas fases do desenvolvimento cerebral que compreende a divisão celular, migração neuronal, diferenciação das células e sinaptogênese (AZMITIA, 2001). Ademais, o aumento dos níveis de 5-HT na fenda sináptica contribui para o desenvolvimento de parâmetros que refletem a integridade do sistema nervoso (CHANG & HAVTON, 2013). Além disso, a manipulação deste sistema parece proteger as células neurais do stress oxidativo durante o desenvolvimento do cérebro (DA SILVA *et al.*, 2014). Esta interessante evidência sugere um papel protetor do desenvolvimento neural associado à atividade serotoninérgica.

Outrossim, a 5-HT desempenha papel chave no controle da excitabilidade de motoneurônios trigeminais (MNT), importante componente do Centro de Padrão Gerador (CPG) que regula a ritmicidade dos movimentos mastigatórios (KOLTA A; DUBUC R & LUND JP, 1993). Os MNT recebe uma densa aferência de neurônios serotoninérgicos, além de conter uma grande quantidade de receptores serotoninérgicos (KOLTAA; DUBUC R & LUND JP, 1993). Dessa forma, a 5-HT se liga aos receptores serotoninérgicos, particularmente 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>, aumentando as propriedades de disparo dos MNT (HSIAO et al., 2002). Portanto, o aumento da atividade serotoninérgica facilita a despolarização e em consequência a excitabilidade dos MNT (KURASAWA I; TODA K & NAKANURA Y, 1990). Além disso, em virtude da 5-HT aumentar a excitabilidade dos MNT, sua ação contribui para a manutenção da posição da mandíbula e facilitação dos movimentos mandibulares durante a ingestão dos alimentos (HSIAO *et al.*, 1997). Portanto, é provável que a manipulação do sistema serotoninérgico possa atenuar as incapacidades mastigatórias observadas em patologias do sistema nervoso, como a PC.

Além da 5-HT influenciar aspectos motores, também foi observado que este neurotransmissor atua sobre parâmetros sensoriais orais (JABER *et al.*, 2014). Durante a fase oral da alimentação, foi demonstrado que a 5-HT exerce papel importante nas papilas gustativas, uma vez que a 5-HT é expressa nas células receptoras do sabor (células tipo III), essenciais para a transmissão da gustação ao SNC. Associado a isto, foi detectado a presença da 5-HT e de seu transportador (SERT) nas papilas circunvaladas (REN e colab., 1999). Dessa forma, é de interesse avaliar a capacidade da manipulação do sistema serotoninérgico em reverter ou minimizar o impacto sobre sensibilidade intra-oral, observados na PC.

Além de desempenhar papel importante em aspectos sensoriais e motores da mastigação, a 5-HT participa do desenvolvimento das estruturas craniofaciais, incluindo: mandíbula, dentes, articulação têmporo-mandibular (ATM), língua e músculos da mastigação (MOISEIWITSCH, JR, 2000; BYRD KE & SHESKIN TA, 2001). Neste contexto, a 5-HT é envolvida na morfogênese e maturação das estruturas craniofaciais, uma vez que todos os receptores serotoninérgicos estão amplamente distribuídos nas estruturas craniofaciais (GALLI C; MACALUSO G & PASSERI G, 2013; MOISEIWITSCH, JR, 2000). Portanto, um intacto sistema serotoninérgico é necessário para maturação de estruturas envolvidas na mastigação.

### **3.7 Análise do Impacto da Paralisia Cerebral sobre o Sistema Serotoninérgico e Possível Efeito do Triptofano sobre a Mastigação em Animais Deficientes**

Evidências experimentais demonstraram que o desenvolvimento do sistema serotoninérgico é comprometido em variados modelos experimentais de PC (BULLER; WIXEY & REINEBRANT, 2012; REINEBRANT; WIXEY & BULLER, 2013). Neste contexto, foi observado em modelos experimentais de inflamação materna, induzido durante o período de gestação, uma redução nos níveis de 5-HT assim como diminuição nos neurônios serotoninérgicos no córtex somatossensorial e hipocampo (KANNAN *et al.*, 2011). Além disso, achados semelhantes também foram observados em ratos submetidos a HI, durante os primeiros dias de vida pós-natal (WIXEY; REINEBRANT & BULLER, 2011). Entre as áreas afetadas, a injúria dos neurônios serotoninérgicos foi observada no córtex motor e somatossensorial, tálamo ventrolateral e hipotálamo lateral (REINEBRANT; WIXEY & BULLER, 2012). A encefalopatia promovida pela HI promoveu redução dos neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe, situados no tronco encefálico (REINEBRANT, H *et al.*, 2010). Além disso, a indução da HI no terceiro dia de vida pós-natal promoveu em ratos, redução da expressão do transportador SERT no cérebro (REINEBRANT, H *et al.*,

2010). Além disso, foi observado em ratos submetidos à HI no sétimo dia de vida pós-natal, diminuição do 5HIAA, principal metabólito da 5-HT (BULLER; WIXEY & REINEBRANT, 2012). É importante ressaltar também que o impacto sobre o sistema serotoninérgico foi observado nas proximidades da área do CPG que regula os movimentos de sucção e mastigação (REINEBRANT, H *et al.*, 2010).

No que se refere ao TRI, evidências experimentais revelaram que a indução de PC a partir da inflamação materna promoveram mudanças no metabolismo do TRI, levando a ativação de micróglia e lesões excitotóxicas, resultantes da produção de marcadores do estresse oxidativo (ZHANG, Z *et al.*, 2018; WILLIAMS, M *et al.*, 2017). De modo contrário, a administração de TRI reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias no córtex cerebral em animais submetidos a PC, o que demonstra seu papel neuroprotetor (DEL ANGEL-MEZA, AR *et al.*, 2011). Contudo, não é descrito na literatura os efeitos da administração de TRI e aumento dos níveis de 5-HT no desenvolvimento dos movimentos mastigatórios e fenótipo dos músculos da mastigação, em modelo experimental de PC.

Quanto aos aspectos clínicos relacionados ao tratamento de crianças com PC, intervenções nutricionais comumente são realizadas, sobretudo nas unidades neonatal de cuidado intensivo (NG, DV *et al.*, 2017). Ademais, o leite materno ofertado a crianças pré-maturas com PC dispõe de um inadequado aporte de nutrientes (CORVAGLIA, LA *et al.*, 2010). Neste sentido, estudos revelam que um adequado aporte nutricional, durante as primeiras semanas de vida pós-natal está associado a maior crescimento e neurodesenvolvimento em crianças com PC (CORVAGLIA, LA *et al.*, 2010; STEPHENS, BE *et al.*, 2009). Além disso, evidências provindas de estudos em humanos demonstraram a eficácia e segurança em ofertar altos níveis de aminoácidos, incluindo o TRI (NG, DV *et al.*, 2017; STEPHENS, BE *et al.*, 2009).

Achados encorajadores já mostram que a manipulação do sistema serotoninérgico tem sido indicada como recurso terapêutico para tratamento de danos motores em outras patologias vasculares e nervosas, como o Acidente Vascular Encefálico e a Depressão, o que sugerem a possibilidade de melhorias semelhantes na paralisia cerebral (PINTO *et al.*, 2017; BUDHDEO e RAJAPAKSA, 2011). Portanto, sugere-se que o aumento da atividade serotoninérgica induzido pela terapia pós-natal com o TRI pode auxiliar na maturação da mastigação em animais submetido a PC. Assim, os resultados obtidos a partir deste estudo poderá contribuir na inserção de estratégias terapêuticas nutricionais em atenuar os danos na mastigação, observados em crianças com PC. Diante do exposto, a hipótese deste estudo é que a suplementação com TRI aumenta os níveis cerebrais de 5-HT, o que restaura a atividade serotoninérgica no CPG da sucção e mastigação, levando ao aumento da quantidade e qualidade dos movimentos mastigatórios, em modelo experimental de PC. Para investigar profundamente nossa hipótese, nós analisamos o efeito da administração do TRI, durante o período de lactação, sobre parâmetros funcionais e morfológicos da mastigação, em ratos submetidos a AP associado a RSM das patas posteriores.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Um total de 80 ratos albinos da linhagem *Wistar* foram obtidos do Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Para obtenção dos filhotes, as ratas progenitoras foram escolhidas conforme os seguintes critérios: não ter parentesco familiar, idade entre 90 e 120 dias de vida, peso entre 220 e 250 gramas e primíparas. Estes cuidados foram adotados para minimizar possíveis influências genéticas e fisiológicas nos resultados. A prenhez foi diagnosticada pela presença de espermatozóide no esfregaço vaginal, quando presente as fêmeas foram alocadas em gaiolas individuais.

### **4.2 Grupos Experimentais**

Após o nascimento dos filhotes, as ninhadas foram ajustadas para conter oito animais por ninhada. Os filhotes machos foram utilizados para as análises, e os filhotes fêmeas foram utilizados para padronização da quantidade de animais por ninhada. Em seguida, os animais foram randomicamente distribuídos em quatro grupos experimentais de acordo com a indução da PC e administração do TRI: Grupo Controle Salina (CS, n= 20), grupo Controle TRI (CT, n=20), grupo PC Salina (PCS, n=20) e grupo PC TRI (PCT, n=20). Os filhotes receberam solução salina (NaCl 0.9%, Controle Salina e PC Salina) ou TRI (dose de 50 mg/kg, Controle TRI e PC TRI), via subcutânea durante a lactação, diariamente, iniciando no primeiro dia de vida pós-natal (P1) até o P21. De acordo com uma recente revisão sistemática, uma dose de 50 mg/kg de TRI é um método eficaz de aumentar os níveis cerebrais de 5-HT (CONTREIRAS CARNEIRO *et al.*, 2018). Além disso, o TRI foi administrado no início do ciclo escuro, uma vez que corresponde ao pico de expressão da 5-HT em variados segmentos do sistema nervoso (MATEOS *et al.*, 2009). Todos os ratos foram mantidos em ciclo invertido de 12/12 h (escuro 20:00 – 8:00) em uma temperatura de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$

e alimentados por uma dieta padrão e ad libitum (63% carboidrato, 23% proteína and 11% lipídeo and 3.6 Kcal/g) Presence®. Todos os experimentos e cuidados com animais foram realizados de acordo as diretrizes do ARRIVE (Animal Research: Reporting of in Vivo Experiments). Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (#0050/2016).

### **4.3 Modelo Experimental de Paralisia Cerebral**

O modelo experimental de paralisia cerebral foi baseado nos experimentos de Strata et al. (2004)(STRATA *et al.*, 2004), Coq et al. (2008)(COQ *et al.*, 2008) e Marcuzzo et al. (2008)(MARCUIZZO *et al.*, 2008). Este modelo associa a AP a um modelo de RSP das patas posteriores semelhante à falta de movimento característica da PC. Os filhotes foram submetidos a dois episódios de anóxia pós-natal, no P0 e P1. Os filhotes foram colocados dentro de uma câmara de vidro parcialmente imersa em água a 37 graus e expostos a nitrogênio (100%) a 9L/min por 12 minutos cada. Em seguida, os filhotes foram ressuscitados em temperatura ambiente e devolvidos as suas respectivas mães. Do P2 ao P28 foi realizada a restrição sensório-motora das patas posteriores durante 16 horas por dia. Nas 8 horas restantes, a livre movimentação do animal era permitida. Para a realização da RSM, foi utilizado um molde de epóxi de forma que era permitido apenas movimentos limitados da articulação do quadril, deixando os membros posteriores estendidos com o auxílio de fita adesiva complementar ao molde reduzido, sem que a eliminação de urina e fezes e os cuidados maternos sejam prejudicados. Este modelo foi adotado em virtude de sua eficácia em reproduzir diversas características clínicas típicas da PC.

### **4.4 Análises Experimentais**

#### **4.4.1 ANÁLISE DO PESO CORPORAL**

O peso corporal dos filhotes foi analisado nos dias 1, 8, 14, 21 e 29 dias de vida pós-natal. Para mensuração do peso corporal, foi utilizado uma balança eletrônica

digital (Marte, BL3200H model, capacidade de 3.2 kg and sensibilidade de 0.1 g). Esta análise foi realizada com o propósito de avaliar o papel da indução da PC, bem como a administração do TRI sobre a integridade física e desenvolvimento somático dos animais.

#### 4.4.2 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR

A análise do consumo alimentar durante a lactação foi realizada de acordo com a adaptação do método descrito por Perillan et al (PERILLAN *et al.*, 2007). Inicialmente, os filhotes foram separados de suas mães por duas horas, mantidos em uma incubadora aquecida, com maravalha. Em seguida, os filhotes foram devolvidos para as suas respectivas mães durante uma hora para amamentação. O peso corporal dos filhotes foi mensurado após as duas horas de separação e uma hora depois de terem retornado para as suas mães. A diferença do peso obtida a partir das duas mensurações foi utilizada para estimar o consumo de leite materno na primeira semana (S1, no P7/P8), segunda semana (S2, no P14/P15) e terceira semana (S3, no P19/P20) de vida pós-natal. Além disso, foi mensurado o consumo alimentar a partir da mastigação na terceira semana de vida pós-natal (S3, no P21) (LACERDA *et al.*, 2017). Para mensuração do peso, foi utilizado uma balança de precisão (*Shimadzu*, capacidade de 220 g, e sensibilidade de 0.01 g). Para obtenção de resultados confiáveis, foi realizado estimulação vesical antes da obtenção do peso, para promover excreção de urina e fezes. Esta técnica foi realizada a partir da fricção de um objeto macio na região genital dos filhotes, afim de estimular excreção de fezes e urina.

#### 4.4.3 ANÁLISE DOS PARÂMETROS MOTORES DA MASTIGAÇÃO

Os parâmetros motores da função mastigatória foram avaliados nos filhotes no vigésimo primeiro dia de vida pós-natal (P21), de acordo com o protocolo de Ferraz-Pereira et al (FERRAZ-PEREIRA *et al.*, 2015). Inicialmente os animais foram

submetidos a um período de três horas de privação alimentar. Em seguida, os animais foram alocados individualmente em uma gaiola de acrílico transparente, e filmados para quantificação dos parâmetros motores da mastigação. A partir da análise dos vídeos, foram quantificados os seguintes parâmetros: duração do período de mastigação rítmica (s), número de ciclos mastigatórios (n) e frequência dos ciclos mastigatórios (n/s). A análise dos parâmetros motores da função mastigatória foi realizada com o objetivo de mensurar a eficiência da mastigação, isto é, a capacidade da mastigação em triturar o alimento em micropartículas para formação do bolo alimentar. O período de mastigação rítmica é caracterizado por movimentos verticais e regulares da mandíbula, denominados de ciclos mastigatórios, afim de triturar e pulverizar o alimento entre os molares superiores e inferiores. A frequência dos ciclos mastigatórios consiste no quociente entre o número de ciclos mastigatórios realizados durante o período de mastigação rítmica. Para garantir a confiabilidade das análises, os vídeos foram analisados e quantificados por um avaliador treinado e cego para o conhecimento de qual grupo experimental pertencia cada animal. Esta estratégia foi realizada com o objetivo de minimizar a influência do risco de viés de mensuração dos resultados.

#### 4.4.4 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE INTRA-ORAL

Aos 17 dias de idade pós-natal (P17), os animais foram submetidos a análise da sensibilidade intra-oral de acordo com o protocolo adaptado de Chao Yi-Ho et al 2014. Inicialmente, os animais foram alocados individualmente em uma gaiola de acrílico, sendo visualizados por baixo por meio de um piso transparente. O teste consistiu na administração de uma solução contendo sacarose (1%, 1ml), na boca do animal, através de uma seringa acoplada a uma cânula de gavagem (Insight IC810). A solução de sacarose provoca as seguintes reações hedônicas ou de “gosto”: protrusões rítmicas da língua e lambar as patas. A partir das filmagens, foram

contabilizados a duração e o número de cada comportamento realizado pelo animal. As filmagens foram analisadas por um avaliador treinado e qualificado, cego para o conhecimento do grupo experimental dos animais. Esta análise foi realizada porque pode refletir a integridade das papilas gustativas situadas na superfície da língua.

#### 4.4.5 ANÁLISE DO FENÓTIPO DO MÚSCULO MASSETER

No 29º dia pós-natal (P29) os animais foram sacrificados por decapitação. O feixe superficial do músculo masseter foi dissecado e imediatamente pesado. A massa (g) de cada músculo (MM) foi mensurada e, a partir da massa corporal (MC, g), a relação MM/MC foi obtida. Após a coleta do peso, os músculos foram imersos em n-hexano e armazenados a -80 °C para realização da análise histológica. Para análise histológica, secções transversais (10µm) dos músculos com um criostato foram obtidas e coradas pela técnica da ATPase miofibrilar, de acordo com o protocolo de Brooke e Kaiser. Esta análise foi realizada com o propósito de verificar como a manipulação nutricional e a indução da PC podem afetar a estrutura dos músculos mastigatórios. Esta técnica permite a identificação dos tipos de fibras musculares (fibra tipo I, IIA e IIB), de acordo com a intensidade da reação com a enzima ATPase após pré-incubação ácida (pH 4,7). Imagens foram capturadas utilizando um microscópio (Olympus BX-41, objetiva 10x). Todas as fibras musculares foram contadas em cada corte histológico e os valores referentes aos diferentes tipos de fibras foram expressos em percentual do número total. Para contagem das células foi utilizado o software MENSURIN PRO versão 3.2 (Jean-François Mother, Amiens, France). Esta análise foi realizada com o propósito de verificar como propriedades musculares podem ser afetadas pela indução da PC experimental, bem como avaliar o potencial terapêutico do TRI.

#### 4.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o Programa estatístico R (The R Foundation for Statistical Computing, Institute for Statistics and Mathematics, Wien, Austria). Os resultados foram expressos em média e erro padrão da média (EPM). Foi realizado a Análise dos Componentes Principais (PCA) para reduzir a alta dimensionalidade e para avaliar as possíveis relações entre grupos de variáveis. PCA é definido como uma transformação ortogonal linear dos dados em novos eixos de coordenadas ou principal componente. Foi realizado PCA em 2 grupos de variáveis, incluindo: 1) consumo alimentar com 4 variáveis (sucção semana 1, sucção semana 2, sucção semana 3, mastigação semana 3), 2) parâmetros motores da mastigação composto de 3 variáveis (duração da mastigação rítmica, número de ciclos mastigatórios, frequência dos ciclos da mastigação). Foi obtido uma pontuação para cada rato em cada grupo de variáveis ao longo do eixo x (PC1) do PCA. O objetivo foi correlacionar as pontuações de cada rato nos dois grupos de variáveis. Para comparação de médias entre os grupos, foi realizado o teste ANOVA two-way medidas repetidas e pós-teste de *Tukey* para análise de peso corporal e consumo alimentar e ANOVA two-way e pós-teste de *Tukey* para os demais parâmetros. Foi realizado Correlação de *Pearson* entre as variáveis que compõem o peso corporal com consumo alimentar e os parâmetros motores da mastigação com o fenótipo do músculo masseter.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Peso Corporal

O peso corporal em ambos os grupos controle aumentou gradativamente de P1 ao P29 [ $F(4,375) = 1201.9$ ;  $p < 0.0001$ ], sem diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos controle tratados com salina ou TRI (Tukey *post hoc* test: P: n.s.; Fig. 1). O peso corporal dos ratos submetidos a PC, tratados com salina ou TRI, foi menor no P14, P21 e P29 comparado com ambos os grupos controle [ $F(3,375) = 75.1$ ;  $P < 0.001$ ]. Contudo, não foi observado diferença no peso corporal entre os grupos PC Salina e PC TRI (Tukey *post hoc* test: P: n.s.), o que sugere um impacto da indução da PC e nenhum efeito advindo da suplementação com TRI (Fig. 1). Além disso, foi observado uma interação entre o tempo e grupo, sugerindo que a diferença do peso corporal entre os grupos controle e PC aumentou no decorrer do tempo [ $F(12,375) = 16.5$ ;  $P < 0.0001$ ].

### 5.2 Consumo Alimentar

De acordo com o PCA obtido a partir da análise das 4 variáveis que compõem a avaliação do consumo alimentar [ $F(3,60) = 4.83$ ;  $P < 0.005$ ], a pontuação ao longo do eixo x (PC1) do grupo Controle Salina ( $0.8 \pm 0.4$ ) não diferiu do grupo Controle TRI ( $0.5 \pm 0.3$ ). De maneira semelhante, a pontuação do grupo PC Salina ( $-0.9 \pm 0.3$ ) não diferiu do grupo PC TRI ( $-0.5 \pm 0.3$ ; Tukey *post hoc* tests: P: n.s.). Além disso, a pontuação de ambos os grupos controle diferiu de ambos os grupos PC, sugerindo que houve um impacto da PC no consumo alimentar a partir da sucção e mastigação (Tukey *post hoc* test  $P < 0.01$ ; Fig. 2A) porém sem efeito específico do tratamento com TRI.

O consumo alimentar a partir da sucção aumentou em ambos os grupos controle da primeira semana até a terceira semana de vida pós-natal [ $F(3,188) = 49.9$ ;  $P < 0.0001$ ] (Fig. 2B). O consumo de leite materno foi reduzido na terceira semana

[F(3,188) = 2.76; P < 0.05] no grupo PC Salina comparado com o grupo Controle Salina (*Tukey post hoc test*: P < 0.05; Fig. 2B). Não foi observado interação entre tempo e grupo [F(9,188) = 1.0; P: n.s.], o que sugere um impacto da PC no consumo de leite especificamente na terceira semana de vida pós-natal. Quanto ao consumo alimentar a partir da mastigação na terceira semana de vida pós-natal [F(3,60) = 4,83, P < 0.05], foi observado uma redução de ração ingerida no grupo PC TRI comparado com o grupo Controle TRI (*Tukey post hoc test*: P < 0.05; Fig. 2B).

Além disso, foi realizado o índice de Correlação de *Pearson* entre o Peso Corporal e Consumo Alimentar, afim de elucidar o impacto da PC e tratamento com TRI sobre ambas variáveis correlacionadas. Foi observado moderada correlação nos grupos Controle Salina ( $r = 0.57$ , P < 0.05), Controle TRI ( $r = 0.69$ , P < 0.05), e PC Salina ( $r = 0.67$ , P < 0.05). Ademais, foi observado alta correlação ( $r = 0.89$ , P < 0.0001) nos animais do grupo PC TRI, o que demonstrou que para uma comparável quantidade de alimento ingerido, os animais do grupo PC TRI apresentam maior aumento de peso corporal.

### 5.3 Parâmetros Motores da Mastigação

De acordo com o PCA obtido a partir das 3 variáveis que compreendem a análise dos parâmetros motores da mastigação [F(3,36) = 36.94; P < 0.0001], a pontuação do grupo PC Salina ( $-2.1 \pm 0.3$ ) diferiu dos grupos PC TRI ( $-0.3 \pm 0.2$ ) e Controle Salina ( $0.4 \pm 0.3$ ) ao longo do eixo x (PC1) (*Tukey post hoc tests*: P < 0.0001) (Fig. 3A). Contudo, não foi observado diferença entre os grupos PC TRI e Controle Salina (*Tukey post hoc test*: P = 0.24, n.s.), enquanto que a pontuação do grupo Controle TRI ( $2.0 \pm 0.2$ ) diferiu da pontuação do grupo Controle Salina (*Tukey post hoc test*: P < 0.0001; Fig. 3A). Esses resultados sugerem que o tratamento com TRI atenuou os efeitos deletérios da PC sobre os parâmetros motores da mastigação.

Para maior compreensão dos efeitos da PC e TRI, foi avaliado de modo específico os parâmetros motores da mastigação no P21. Ambos os grupos PC apresentaram menor duração do período de mastigação rítmica comparado com seus respectivos grupos controle (*Tukey post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig. 3B) [ $F(3,36) = 10.31$ ;  $P < 0.0001$ ]. Os animais do grupo PC TRI apresentaram uma tendência a redução no número de ciclos mastigatórios, comparado com o grupo Controle TRI (*Tukey post hoc* test:  $P = 0.07$ ; Fig. 3C) [ $F(3,36) = 3.733$ ;  $P < 0.05$ ]. Por fim, os animais do grupo PC Salina [ $F(3,36) = 10.73$ ;  $P < 0.0001$ ] apresentaram menor frequência de ciclos da mastigação comparado com o grupo Controle Salina e PC TRI (*Tukey post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig. 3D). Esses resultados sugerem que a PC reduziu a eficiência da mastigação, enquanto que o tratamento com TRI atenuou o efeito deletério provocado pela indução da PC.

#### **5.4 Sensibilidade Intra-oral**

Os animais de ambos os grupos PC apresentaram menor duração e quantidade das reações de gosto (lamber as patas e protrusões rítmicas da língua) comparado com seus respectivos grupo controle (*Tukey post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig. 4). De modo oposto, os animais do grupo PC TRI apresentaram maior duração das reações de gosto quando comparado com os animais do grupo PC Salina (*Tukey post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig. 4), o que sugere recuperação parcial da sensibilidade intra-oral após o tratamento com a PC.

#### **5.5 Fenótipo do Músculo Masseter**

O peso relativo do músculo masseter em ambos os grupos submetidos a PC foi menor (*Tukey post hoc* tests:  $p < 0.001$ ; Fig. 5A) comparado com seus respectivos grupos controle [ $F(3,16) = 133$ ;  $p < 0.0001$ ]. De modo contrário, o peso relativo do músculo masseter foi maior em ambos os grupos tratados com TRI comparado com seus respectivos grupos tratados com salina (*Tukey post hoc* tests:  $P < 0.001$ ),

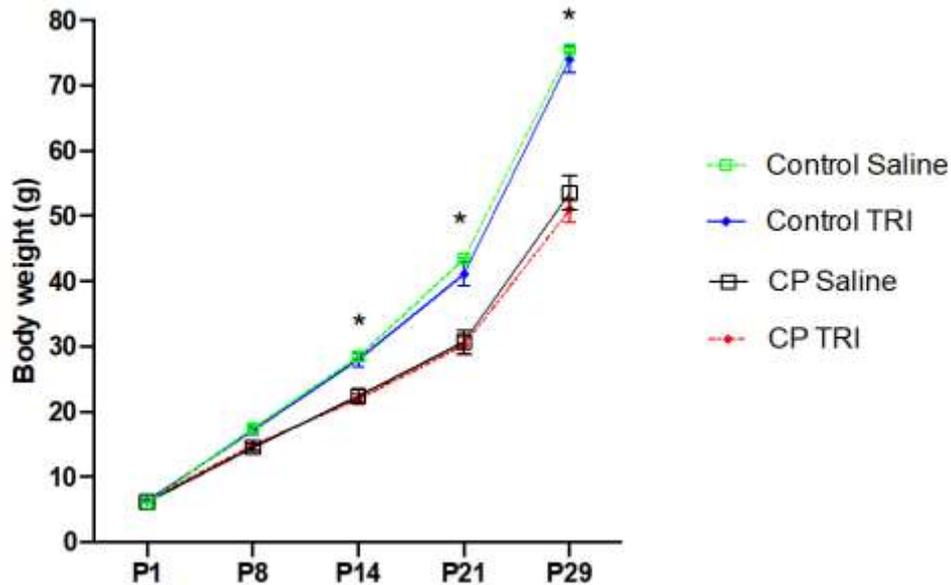
sugestivo de parcial recuperação do peso do músculo masseter após o tratamento com TRI (Fig. 5A).

Quanto a proporção dos diferentes tipos de fibras do músculo masseter no P29 (Fig. 5 C), ambos os grupos PC apresentaram um aumento na proporção de fibras tipo IIA [ $F(3,16) = 15.5$ ;  $P < 0.0001$ ] associado a uma redução das fibras tipo IIB [ $F(3,16) = 13.8$ ;  $P < 0.0001$ ] comparado com seus respectivos grupos controle (*Tukey post hoc tests*:  $P < 0.05$ ) (Fig. 5B). Além disso, o tratamento com TRI em ambos os grupos controle e PC, promoveu efeito oposto (*Tukey post hoc test*:  $P < 0.05$ ), sugestivo de que o tratamento com TRI reverteu parcialmente os efeitos adversos no fenótipo do músculo masseter após indução da PC (Figure 5 B, C).

### **5.6 Relações Funcionais entre Variáveis Específicas usando PCA**

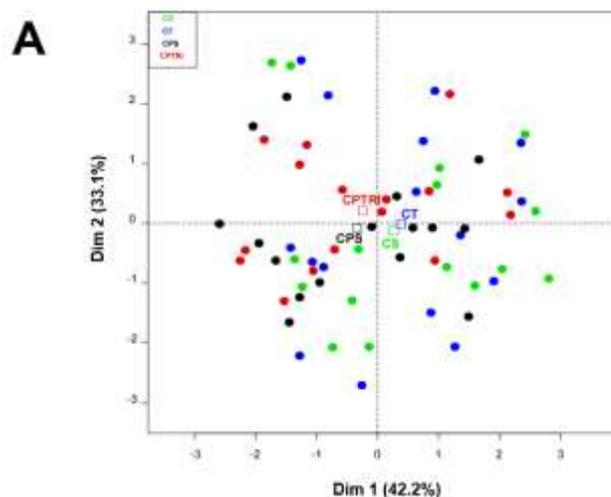
Foi observado moderada correlação entre parâmetros funcionais (número de ciclos mastigatórios e frequência da mastigação) e morfológicos (peso relativo, proporção das fibras IIA e fibras IIB do músculo masseter) (Tabela 1). De acordo com a Tabela 1, quanto maior o peso relativo e proporção das fibras IIB do músculo masseter, maior o número e maior a frequência dos ciclos da mastigação. De modo contrário, quanto maior a proporção das fibras IIA do músculo masseter, menor o número e frequência dos ciclos da mastigação. Estes resultados indicam que o aumento na quantidade de movimentos da mastigação leva a um aumento na proporção das fibras do tipo IIB.

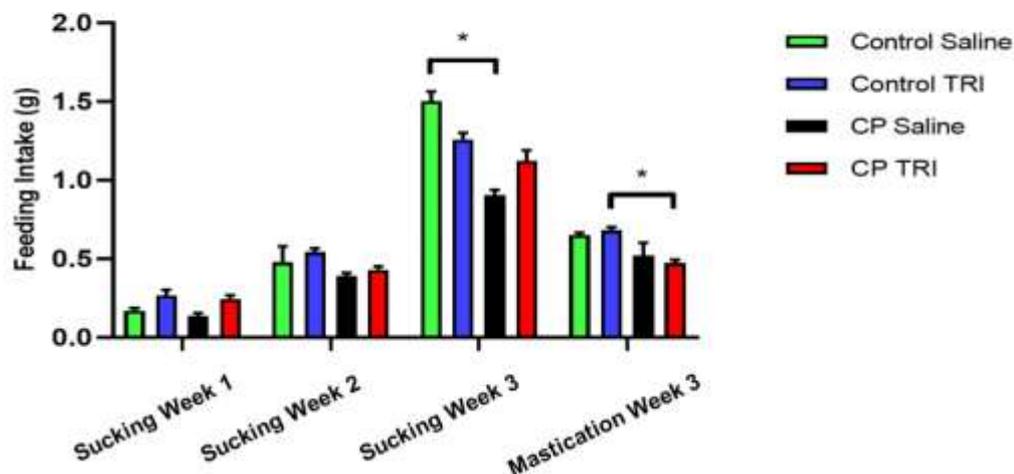
**Figura 1 – Peso Corporal**



**Figura 1 Efeito da PC e do TRI sobre o Peso Corporal:** Peso corporal de ratos do grupo Controle Salina (n = 25), Controle TRI (n = 16), PC Salina (n = 23) e PC TRI (n = 16) nos 1, 8, 14, 21 e 29 dias de vida pós-natal. O peso corporal de ambos os grupos PC foi menor comparado com os grupos Controle (\*P <0.001).

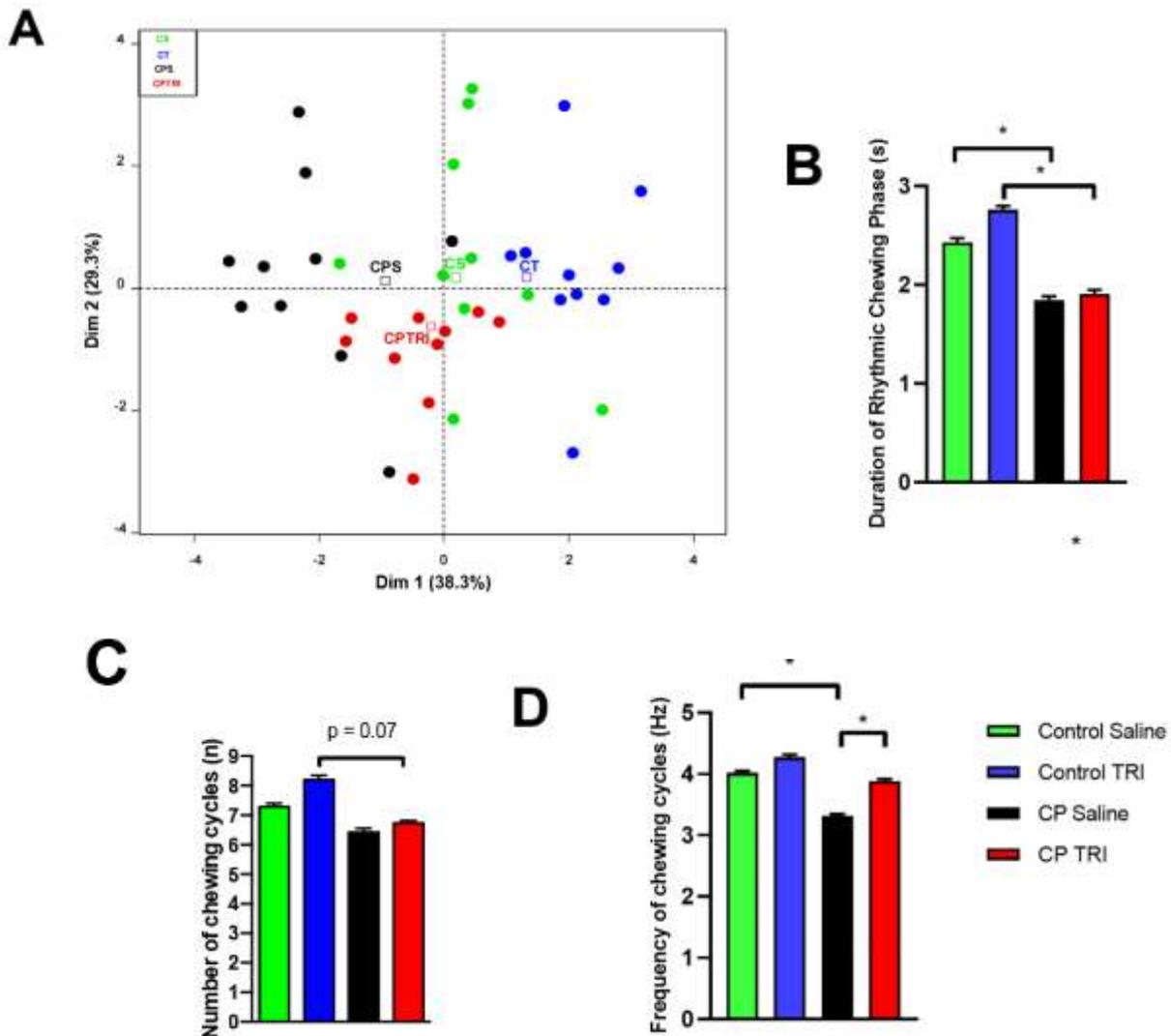
**Figura 2 A – Consumo Alimentar**



**B**

**Figura 2 Efeito da PC e do TRI sobre o Consumo Alimentar:** (A) Análise do PCA das variáveis do consumo alimentar (sucção-semana 1, sucção-semana 2, sucção-semana 3, mastigação-semana 3). (B) Consumo alimentar a partir da sucção e mastigação dos filhotes dos grupos Controle Salina (n = 13), Controle TRI (n = 14), PC Salina (n = 13) and PC TRI (n = 11). (A) A pontuação da análise do PCA não diferiu entre os grupos Controle Salina e Controle TRI, assim como entre os grupos PC Salina e PC TRI. Contudo, a pontuação diferiu entre ambos os grupos PC comparado com seus respectivos grupos Controle ( $P < 0.01$ ). (B) O consumo de leite materno na terceira semana de vida pós natal foi reduzido nos animais do grupo PC Salina comparado com o grupo Controle Salina ( $*P < 0.05$ ). A ingestão de alimento a partir da mastigação na terceira semana de vida pós-natal foi reduzida no grupo PC TRI comparado com o grupo Controle TRI ( $*P < 0.05$ ).

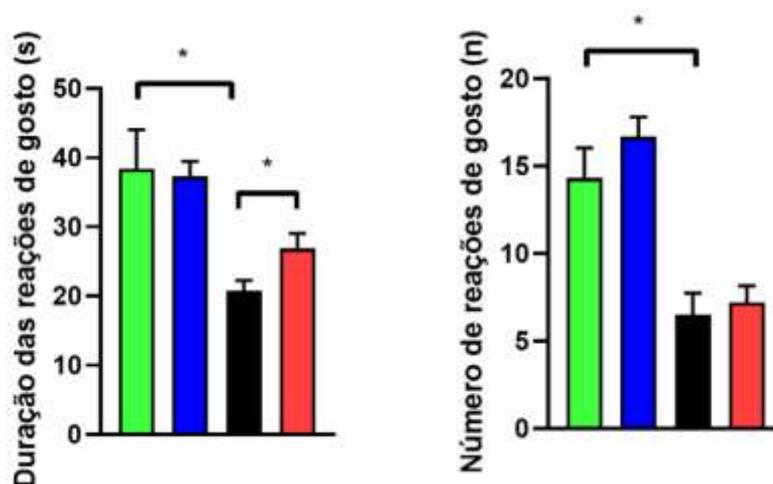
**Figura 3: Parâmetros Motores da Mastigação**



**Figura 3 Efeito da PC e do TRI sobre os Parâmetros Motores da Mastigação:** (A) Análise do PCA das variáveis que compreendem os parâmetros motores da mastigação (duração do período de mastigação rítmica, número de ciclos mastigatórios e frequência dos ciclos da mastigação). (B) duração em segundos do período de mastigação rítmica, (C) Número de ciclos mastigatórios e (D) frequência dos ciclos da mastigação dos grupos Controle Salina (n = 10), Controle TRI (n = 10), PC Salina (n = 10), PC TRI (n = 10) no vigésimo primeiro dia de vida pós-natal (P21). (A) a pontuação da análise do PCA diferiu entre os grupos PC Salina com PC TRI e

Controle Salina ( $P < 0.0001$ ). Não foi observado diferença entre os grupos PC TRI e Controle Salina, enquanto que o grupo Controle TRI diferiu do grupo Controle Salina ( $P < 0.0001$ ). (B) Ambos os grupos PC apresentaram redução na duração do período de mastigação rítmica comparado com seus respectivos grupos controle ( $*P < 0.05$ ). (C) O grupo PC TRI apresentou uma tendência a redução no número de ciclos mastigatórios comparado com o grupo Controle TRI ( $P = 0.07$ ). (D) Os animais do grupo PC Salina exibiram menor frequência dos ciclos da mastigação comparado com o grupo Controle Salina ( $*P < 0.05$ ). Os animais do grupo PC TRI apresentaram aumento da frequência dos ciclos da mastigação comparado com PC Salina ( $*P < 0.05$ ).

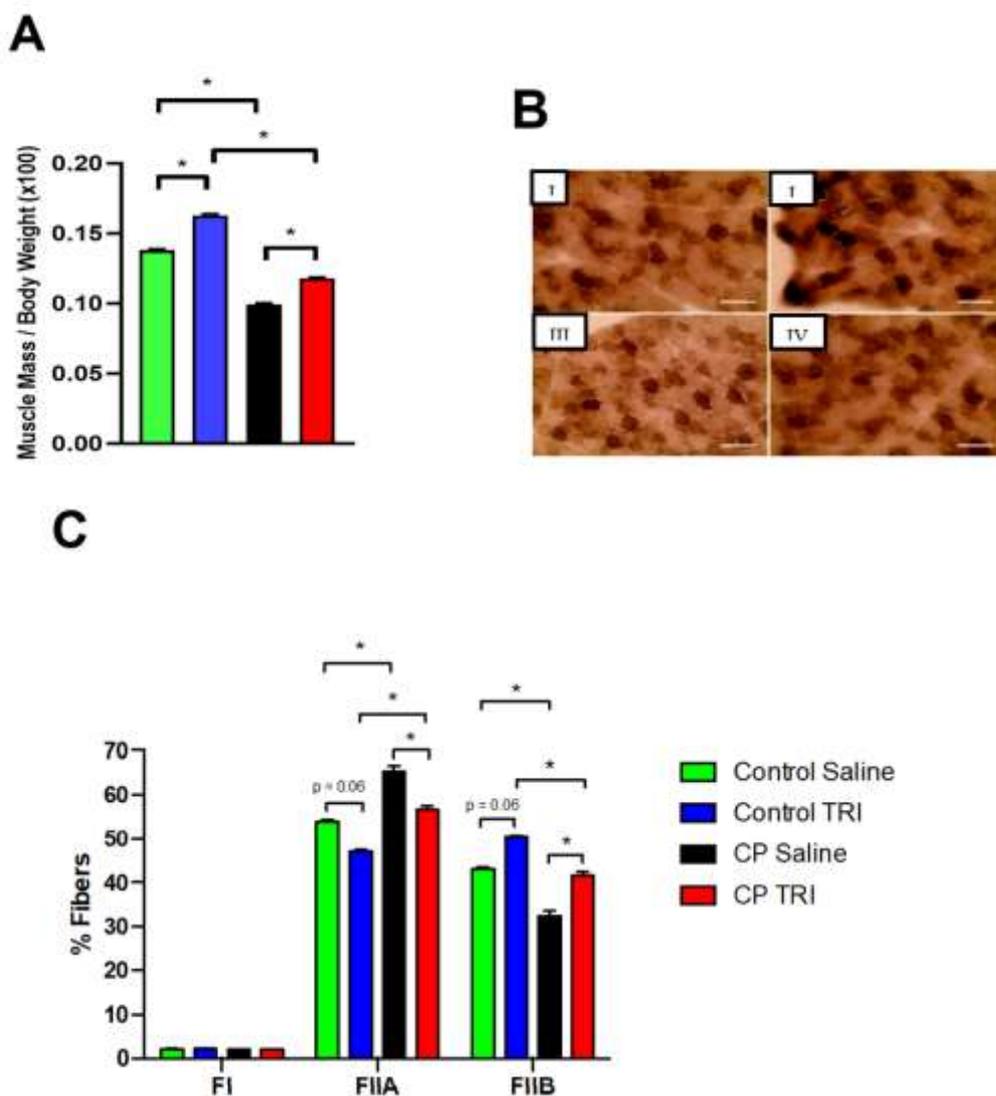
**Figura 4 – Sensibilidade Intra-oral**



**Figura 4 Efeito da PC e do TRI sobre a Sensibilidade Intra-oral:** Duração (s) e quantidade (n) das reações de gosto (protrusões rítmicas da língua e lambr as patas) dos animais dos grupos Controle Salina (n = 5), Controle TRI (n = 5), PC Salina (n = 5), PC TRI (n = 5) no décimo sétimo dia de vida pós-natal (P17). Os animais de ambos

os grupos PC apresentaram menor duração e quantidade das reações de gosto (lamber as patas e protrusões rítmicas da língua) comparado com seus respectivos grupos controle (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.05$ ). De modo oposto, os animais do grupo PC TRI apresentaram maior duração das reações de gosto quando comparado com os animais do grupo PC Salina (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig).

**Figura 5 – Fenótipo do Músculo Masseter**



**Figura 5 Efeito da PC e do TRI sobre o Fenótipo do Masseter:** (A) Peso relativo, (B) cortes histológicos dos grupos experimentais (Controle Salina – I, Controle TRI –

II, PC Salina – III, PC TRI – IV) e (C) proporção em % das fibras do tipo I (escuras), IIA (claras) e IIB (acinzentadas) do músculo masseter, dos grupos Controle Salina (n = 5), Controle TRI (n = 5), PC Salina (n = 5), PC TRI (n = 5) no vigésimo nono dia de vida pós natal (P29). (A) O peso relativo do músculo masseter foi menor no grupo PC Salina comparado com Controle Salina (\*P < 0.001). O peso relativo do músculo masseter foi maior em ambos os grupos tratados com TRI comparado com seus respectivos grupos Salina (\*P < 0.001). (C) Ambos os grupos PC apresentaram aumento na proporção das fibras IIA associado a redução nas fibras IIB, comparado com seus respectivos grupos controle (\*P < 0.05). O tratamento com TRI promoveu efeito oposto quando comparado Controle Salina com Controle TRI (P = 0.06), e PC Salina com PC TRI (\*P < 0.05).

**Tabela 1 - Correlações entre variáveis funcionais e morfológicas da Mastigação**

<b>Variáveis</b>	<b>Número de Ciclos Mastigatórios (n)</b>	<b>Frequência dos Ciclos da Mastigação (Hz)</b>
<b>Masseter (g)</b>	0.449 *P < 0.05	0.686 *P < 0.05
<b>Masseter - FIIA</b>	- 0.428 *P < 0.05	- 0.735 *P < 0.05
<b>Masseter - FIIB</b>	0.428 *P < 0.05	0.749 *P < 0.05

**Tabela 1:** Correlações entre variáveis funcionais e morfológicas, baseado na pontuação individual ao longo do eixo x (PC1), usando PCA \*p < 0.05.

## 6 DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo analisar os efeitos da indução experimental da PC sobre o peso corporal, consumo alimentar, sensibilidade intra-oral, parâmetros motores da mastigação e fenótipo do músculo masseter. Além disso, este foi o primeiro estudo que avaliou o potencial terapêutico do aminoácido TRI em minimizar os danos da mastigação em ratos submetidos a PC experimental. De acordo com nossos achados, a indução da PC promoveu os seguintes resultados: 1) redução do peso corporal e consumo alimentar durante as primeiras semanas de vida pós-natal, 2) diminuição dos movimentos da mastigação, 3) redução da sensibilidade intra-oral, 4) redução no peso e proporção das fibras tipo IIB do músculo masseter. Em relação aos dados obtidos pelos animais submetidos a PC e tratado com TRI, foi verificado: 1) nenhum efeito sobre o peso corporal, contudo para uma quantidade comparável de alimento ingerido, os animais do grupo PC TRI apresentaram maior peso corporal, 2) aumento na sensibilidade intra oral, 3) aumento nos movimentos da mastigação e 4) aumento no peso e na proporção das fibras do tipo IIB do músculo masseter. Estes resultados demonstram que a manipulação nutricional com a administração do TRI pode contribuir em reduzir os danos na mastigação em ratos submetidos a PC experimental.

### 6.1 Peso Corporal

A indução da PC limitou o ganho de peso corporal quando comparado com os animais do grupo controle. Este resultado corroborou com achados obtidos em estudos onde foi avaliado o mesmo modelo experimental de PC e observado similar redução no peso corporal (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017; SILVA, K.O.G *et al.*, 2016). O impacto sobre o peso corporal pode ter sido resultante dos danos motores que o modelo é capaz de reproduzir. Ratos submetidos a AP e RSM das patas posteriores desenvolvem déficits na locomoção e espasticidade dos músculos das patas

posteriores, o que pode ter dificultado a capacidade do animal se locomover e alcançar o mamilo materno ou os *pellets* (fragmentos) de ração. (SILVA, K.O.G *et al.*, 2016; STRATA *et al.*, 2004). Além disso, de acordo com estudo prévio, este modelo de PC reproduz danos na sucção e nos movimentos mastigatórios (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017). Portanto, nossos resultados podem ser explicados pela capacidade da AP e RSM em induzir problemas na locomoção bem como prejuízos na sucção e mastigação.

A ausência de efeito do peso corporal após suplementação com TRI é corroborado por estudo prévio, onde não foi observado diferença no peso corporal em ratos *Wistar* avaliados em idades similares e tratados com dieta rica em TRI durante o primeiro mês de vida pós-natal (SILVA, LCA *et al.*, 2017). Contudo, foi observado uma alta correlação entre peso corporal e consumo alimentar em ratos submetidos a PC e tratados com TRI. Nossos resultados demonstraram que para uma quantidade comparável de alimento ingerido, animais do grupo PC TRI apresentaram maior peso corporal. Portanto, sugere-se que a suplementação com TRI acelerou o desenvolvimento somático através do estímulo do consumo alimentar.

## **6.2 Consumo Alimentar**

Nós observamos uma redução do consumo alimentar a partir da sucção em animais submetidos a PC comparado com animais Controle tratados com Salina. Este efeito pode ser resultante da falha na coordenação da sucção e deglutição, observados em estudos prévios em animais submetidos a PC (KANNAN *et al.*, 2011; DERRICK *et al.*, 2007). De acordo com estes estudos, animais submetidos a PC apresentam diversas anormalidades ao receber leite, incluindo regurgitação nasal do leite, incapacidade de manter o leite no interior da cavidade oral e perda do leite por gotejamento (KANNAN *et al.*, 2011; DERRICK *et al.*, 2007). Além disso, a indução de PC em ratos promoveu redução da percepção tátil das vibrissas (VASILEV, DS *et al.*,

2013) e mudanças nas áreas de representação cortical das patas posteriores no S1 (COQ, JO *et al.*, 2008). Portanto, sugere-se que a redução do consumo de leite materno observado no presente estudo, tenha sido resultado de dificuldades na percepção bem como alcance do mamilo materno para amamentação.

O consumo de leite materno não diferiu entre os animais Controle TRI e PC TRI em todas as idades avaliadas. Ademais, animais do grupo PC TRI apresentaram redução do consumo alimentar a partir da mastigação, comparado com os ratos do grupo Controle TRI. Contudo, é importante ressaltar que a administração de TRI levou a um maior peso corporal para uma mesma quantidade de alimento ingerido. De acordo com estudo prévio, a administração subcutânea de 50 mg/kg foi capaz de aumentar os níveis cerebrais de 5-HT

### **6.3 Parâmetros Motores da Mastigação**

A indução de PC promoveu uma redução na eficiência da mastigação quando comparado com animais do grupo controle. Animais do grupo PC Salina apresentaram menor duração no período de mastigação rítmica, comparado com animais do grupo Controle Salina. Este resultado corrobora com estudo prévio (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017). Modelos experimentais de PC promovem múltiplos déficits em funções orofaciais, incluindo: dificuldade em alcançar e adquirir o alimento, redução dos movimentos da cabeça durante alimentação, problemas na função olfatória e prejuízos na coordenação de sucção e mastigação (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017). Uma vez que a integridade dos movimentos da mastigação dependem da maturação das funções orofaciais, déficits em algumas dessas funções podem levar a danos globais no comportamento alimentar (FERRAZ-PEREIRA KN; TOSCANO AE & MANHÃES-DE-CASTRO R, 2013). Portanto, sugere-se que os danos nas funções orofaciais podem ter afetado os movimentos da mastigação, evidenciado a partir da

redução do tempo de processamento oral do alimento e redução no número de movimentos realizados para pulverizar o alimento.

Com o objetivo de obter mais dados sobre a eficiência da mastigação, nós avaliamos a frequência de ciclos mastigatórios, quantidade de movimentos de abrir e fechar da mandíbula executados por segundo. Animais submetidos a PC experimental apresentaram menor frequência dos ciclos mastigatórios comparado com os animais do grupo controle. Contudo, o tratamento com TRI aumentou a frequência dos ciclos mastigatórios em animais submetidos a PC. Assim, a suplementação com TRI aumentou a eficiência da mastigação em preparar o alimento para digestão e subsequente absorção dos nutrientes. Portanto, nós demonstramos que a manipulação nutricional com TRI pode atenuar os danos nos movimentos mastigatórios em animais submetidos a PC. Contudo, não há relatos na literatura que investiguem os efeitos da suplementação com este aminoácido sobre a função da mastigação, o que destaca o caráter pioneiro deste estudo. O aumento da atividade serotoninérgica obtido a partir da suplementação com TRI, aminoácido precursor, parece contribuir com a maturação da mastigação em animais submetidos a PC (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017). A maturação da mastigação é gradual e depende do desenvolvimento do sistema nervoso e sistemas de neurotransmissão, incluindo a 5-HT (KOLTAA; DUBUC R & LUND JP, 1993). Nossos resultados podem ser resultantes do aumento dos níveis cerebrais de 5-HT após administração do TRI. A dose utilizada (50mg/kg) promoveu um aumento expressivo dos níveis de 5-T, sobretudo no tronco encefálico, onde se localiza o CPG da sucção e mastigação (TRULSON ME & TRULSON VM, 1982). Evidências experimentais revelaram que a atividade da 5-HT promove um aumento nas propriedades de disparo dos neurônios trigeminais (HSIAO *et al.*, 2002; KOLTA A; DUBUC R & LUND JP, 1993). De acordo com estes estudos,

elevados níveis de 5-HT promove rápida despolarização dos MNT. Portanto, o aumento na atividade serotoninérgica facilita a despolarização dos MNT e em consequência, aumenta a sua neuro-excitabilidade (HSIAO et al.,2002). Portanto, sugere-se que a administração de TRI promoveu mudanças em propriedades elétricas dos núcleos trigeminais, o que pode ter aumentado a quantidade de movimentos mastigatórios observados no presente estudo,

#### **6.4 Sensibilidade Intra-oral**

Em relação a sensibilidade intra-oral, os animais submetidos a PC experimental apresentaram menor duração e quantidade de reações de “gosto” comparado aos animais do grupo controle. Estes animais foram menos responsivos a administração de um estímulo hedônico provindo de uma solução contendo sacarose. Este resultado corrobora com estudo prévio, onde foi observado similar efeito em animais submetidos ao mesmo modelo experimental de PC (LACERDA, DC et al., 2017). A maioria dos estudos que avaliam os efeitos da PC experimental, exploram os déficits motores, sendo escasso na literatura estudos que investigam os danos em aspectos sensoriais. Em virtude das crianças acometidas por distúrbios nervosos desenvolverem distúrbios sensoriais, em particular falhas na percepção dos sabores dos alimentos (BENFER *et al.*, 2012; SCHIFFMAN *et al.*, 2007), é pertinente investigar o potencial dos modelos experimentais de PC reproduzir tais características, e não se limitar em analisar danos motores. Portanto, o modelo experimental baseado na AP associado a RSM das patas posteriores, é eficaz em replicar aspectos clínicos motores e sensoriais, comparável ao fenótipo da criança com PC. Quanto aos efeitos da administração do TRI, os animais do grupo PC TRI apresentaram redução na duração das reações de “gosto”, mediante estímulo com solução contendo sacarose, comparado com animais submetidos a PC e tratados com Salina. Contudo, não há relatos na literatura que explore os efeitos do tratamento com TRI na percepção do sabor dos alimentos na

PC. Durante a fase oral da alimentação, foi demonstrado que a 5-HT exerce papel importante nas papilas gustativas, uma vez que a 5-HT é expressa nas células receptoras do sabor (células tipo III), essenciais para a transmissão da gustação ao sistema nervoso central. Associado a isto, foi detectado a presença da 5-HT nas papilas circunvaladas situadas na língua (REN e colab., 1999). Portanto, o provável aumento dos níveis de 5-HT, a partir da suplementação com TRI, parece minimizar o impacto sobre sensibilidade intra-oral, observados na PC.

### **6.5 Fenótipo do Músculo Masseter**

Para maior compreensão dos efeitos da indução da PC e tratamento com TRI, foi realizada análise do fenótipo do músculo masseter. Foi observado redução do peso relativo do músculo masseter em ratos submetidos a PC comparado com animais do grupo controle. Este resultado corrobora com estudo prévio, onde foi observado similar redução em animais submetidos a PC (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017). De acordo com nossos achados funcionais, animais submetidos a PC apresentam redução na quantidade de movimentos mandibulares executados durante a mastigação. Portanto, a diminuição do peso relativo do músculo masseter pode ser resultante da redução da demanda funcional do músculo masseter em ratos do grupo PC. Além disso, a redução do peso relativo do músculo masseter é sugestivo de fraqueza e atrofia muscular (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017). Quanto a manipulação nutricional, a suplementação com TRI aumentou o peso relativo em ambos os grupos, controle e PC. Este resultado corrobora com os achados de Byrd *et al.*, 2001, onde foi observado resultado comparável após tratamento com 5-HT (BYRD *et al.*, 2001). Este resultado sugere recuperação parcial do músculo masseter após administração do TRI. Com o objetivo de obter mais dados sobre propriedades morfológicas, foi avaliado a proporção dos diferentes tipos de fibras do músculo masseter. Animais submetidos a PC e tratados com Salina apresentaram um aumento na proporção das

fibras do tipo IIA e concomitante redução da proporção das fibras do tipo IIB, comparado com o grupo Controle Salina. Este resultado corroborou com nossos achados obtidos em estudo prévio (LACERDA, D. C. *et al.*, 2017). Durante as primeiras duas semanas de vida pós-natal, o músculo masseter de ratos é composto predominantemente de fibras do tipo IIA (LANGENBACH *et al.*, 2008). Após o P12, se inicia a transição do comportamento de sucção para a mastigação (WESTNEAT MW & HALL WG, 1992). Esta mudança no comportamento alimentar resulta em um aumento gradativo da proporção das fibras do tipo IIB, em virtude da mastigação ser uma atividade que requer maior força e velocidade de contração muscular (KAWAI, N *et al.*, 2009). Portanto, a menor proporção de fibras do tipo IIB, encontrado em animais submetidos a PC, sugere um atraso na maturação pós-natal do músculo masseter.

A suplementação com TRI em ambos os grupos, controle e PC, preservou uma maior proporção de fibras do tipo IIB comparado com os grupos tratados com Salina. Portanto, nossos resultados sugerem que o tratamento com TRI pode reduzir o efeito deletério da PC sobre o músculo masseter e na mastigação. Este efeito parece ser resultante do papel da 5-HT sobre a morfogênese das estruturas craniofaciais, incluindo a maturação dos dentes, mandíbula, ATM e músculos da mastigação (MOISEIWITSCH, JRD, 2009; BYRD *et al.*, 2001). Durante a maturação do comportamento alimentar, os receptores serotoninérgicos são expressos precocemente nas estruturas craniofaciais em desenvolvimento (GALLI *et al.*, 2013; MOISEIWITSCH, JRD, 2009). Portanto, nossos resultados demonstraram que a modulação da 5-HT a partir da administração do TRI pode ter contribuído na maturação das estruturas craniofaciais, incluindo o músculo masseter.

## **6.6 Relações Funcionais entre Variáveis Específicas Funcionais e Morfológicas**

As correlações entre parâmetros funcionais e morfológicos, verificadas no presente estudo, demonstraram que a quantidade e qualidade dos movimentos mastigatórios parece influenciar o desenvolvimento de aspectos morfológicos da mastigação. Ademais, sugere-se que a estimulação mecânica a partir dos movimentos mastigatórios também podem contribuir com a maturação de estruturas craniofaciais (FERRAZ-PEREIRA KN; TOSCANO AE & MANHÃES-DE-CASTRO R, 2013; ISHIDA T; YABUSHITA T & ONO T, 2013). Além disso, nós também destacamos que os movimentos mastigatórios parecem ter alto potencial de neuroplasticidade, o que pode ter refletido nas propriedades elétricas dos núcleos trigeminais (ISHIDA T; YABUSHITA T & ONO T, 2013). Considerando que a suplementação com TRI levou a um aumento no número de movimentos mastigatórios, nós sugerimos que o tratamento com TRI foi capaz de contribuir com o desenvolvimento de estruturas craniofaciais, em particular o músculo masseter, durante o desenvolvimento neuromotor atípico da PC.

## **7 CONCLUSÕES**

Nós investigamos o potencial terapêutico do TRI em reduzir os danos na mastigação em modelo experimental de PC. A partir dos nossos achados, nós confirmamos nossa hipótese de que o TRI minimiza o aparecimento de déficits na mastigação observados em animais submetidos a PC. Assim, nosso estudo foi o primeiro em avaliar o potencial terapêutico do TRI em atenuar danos funcionais e morfológicos presentes na PC. Portanto, os dados obtidos em nosso estudo podem contribuir na inclusão de uma nova estratégia terapêutica nutricional em atenuar os danos na mastigação em crianças afetadas pela PC.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, MS e colab. **Feeding difficulties in children with cerebral palsy: low-cost caregiver training in Dhaka, Bangladesh.** Child Care Health Dev. 38 (6): 878-8. Nov, 2012.
- ANDREW, Morag J e PARR, Jeremy R e SULLIVAN, Peter B. **Feeding difficulties in children with cerebral palsy.** Archives of disease in childhood - Education & practice edition, v. 97, n. 6, p. 222–229, Dez 2012.
- ANDREW, P.G e colab. **Optimising nutrition to improve growth and reduce neurodisabilities in neonates at risk of neurological impairment, and children with suspected or confirmed cerebral palsy.** BMC Pediatr..17;15:22, Mar 2015.
- ARVEDSON JC. **Feeding children with cerebral palsy and swallowing difficulties.** Eur J Clin Nutr. 67 Suppl 2:S9-12. Dec, 2013.
- AZMITIA EC. **Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis.** Brain research bulletin. 56(5):413-24. 2001.
- BAX, Martin e colab. **Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005.** Developmental medicine and child neurology, v. 47, n. 8, p. 571–6, Ago 2005.
- BLACK, M. M. **Commentary: feeding problems: an ecological perspective.** J Pediatr Psychol, 24, 3, 217-219, Jun, 1999.
- BENFER, Katherine A e colab. **Longitudinal cohort protocol study of oropharyngeal dysphagia: relationships to gross motor attainment, growth and nutritional status in preschool children with cerebral palsy.** BMJ Open, v. 2, n. 4, p. e001460, 2012.
- BENFER, Katherine A. e colab. **Oropharyngeal dysphagia in preschool children with cerebral palsy: Oral phase impairments.** Research in Developmental Disabilities, v. 35, n. 12, p. 3469–3481, Dez 2014.
- BENFER, Katherine A. e colab. **Clinical signs suggestive of pharyngeal dysphagia in preschool children with cerebral palsy.** Research in Developmental Disabilities, v. 38, p. 192–201, Mar 2015.
- BENFER, Katherine A e colab. **The Eating and Drinking Ability Classification System in a population-based sample of preschool children with cerebral palsy.** Developmental Medicine & Child Neurology, v. 59, n. 6, p. 647–654, Jun 2017.
- BOTTI Rodrigues Santos MT e colab. **Teeth grinding, oral motor performance and maximal bite force in cerebral palsy children.** Spec Care Dentist.35(4):170-4. 2015.
- BRIESEMEISTER M e SCHMIDT KC e RIES LG. **Changes in masticatory muscle**

**activity in children with cerebral palsy.** J Electromyogr Kinesiol. 23(1):260-6. Feb, 2013.

BROCARD, Frédéric e colab. **Emergence of intrinsic bursting in trigeminal sensory neurons parallels the acquisition of mastication in weanling rats.** Journal of neurophysiology, v. 96, n. 5, p. 2410–24, Nov 2006.

BROCARD F e TAZERART S e VINAY L. **Do pacemakers drive the central pattern generator for locomotion in mammals?** Neuroscientist. 16(2):139-55. Apr 2010.

BUDHDEO, Sanjay e RAJAPAKSA, Shabna. **Functional recovery in cerebral palsy may be potentiated by administration of selective serotonin reuptake inhibitors.** Medical Hypotheses, v. 77, n. 3, p. 386–388, Set 2011.

BULLER, Kathryn M. e WIXEY, Julie A. e REINEBRANT, Hanna E. **Disruption of the Serotonergic System after Neonatal Hypoxia-Ischemia in a Rodent Model.** Neurology Research International, v. 2012, p. 1–12, 2012.

BYRD KE e SHESKIN TA. **Effects of post-natal serotonin levels on craniofacial complex.** Journal of dental research. 80(8):1730-5. 2001.

CHANG, H.H e HAVTON, L.A. **Serotonergic 5-HT(1A) receptor agonist (8-OH-DPAT) ameliorated impaired micturition reflexes in a chronic ventral root avulsion model of incomplete cauda equina-conus medullaris injury.** Exp Neurol, 239, 210-217, Jan 2013.

CHEN, Aiqing e DIMAMBRO, Nicola e CLOWRY, Gavin J. **A comparison of behavioural and histological outcomes of periventricular injection of ibotenic acid in neonatal rats at postnatal days 5 and 7.** Brain Research, v. 1201, p. 187–195, 27 Mar 2008.

CHEN, Yiquan e GUILLEMIN, Gilles J. **Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy States.** International journal of tryptophan research : IJTR, v. 2, p. 1–19, 2009.

COLVER, A e FAIRHURST, C e PHAROAH, P.O. **Cerebral palsy.** Lancet, 383, 9924, 1240-1249, Apr 5, 2014.

CONTREIRAS CARNEIRO IB e colab. **L-tryptophan administration and increase in cerebral serotonin levels: Systematic review.** European journal of pharmacology. 2018.

COQ, Jacques-Olivier e colab. **Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: Implications for cerebral palsy.** Experimental Neurology, v. 210, n. 1, p. 95–108, Mar 2008.

CORVAGLIA, L Aceti e colab. **Standard fortification of preterm human milk fails to meet recommended protein intake: Bedside evaluation by near-infrared-reflectance-analysis.** Early Hum Dev. 86 (4): 237-40. Apr 2010.

DAHLENG, MO. e colab. **Feeding problems, growth and nutritional status in children with cerebral palsy.** Acta Paediatr. 101(1):92-8. Jan 2012.

DA SILVA, A.I e colab. **Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life.** Can J Physiol Pharmacol, 92, 4, 330-337, Apr 2014.

DEL ANGEL-MEZA, AR e colab. **Protective effects of tryptophan on neuro-inflammation in rats after administering lipopolysaccharide.** Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 65(3):215-9.2011.

DE MOURA, E.G. e LISBOA, P.C. e PASSOS, M.C.F. **Neonatal programming of neuroimmunomodulation--role of adipocytokines and neuropeptides..** Neuroimmunomodulation, v. 15, n. 3, p. 176–188, 2008.

DERRICK, M. e colab. **Preterm Fetal Hypoxia-Ischemia Causes Hypertonia and Motor Deficits in the Neonatal Rabbit: A Model for Human Cerebral Palsy?** Journal of Neuroscience, v. 24, n. 1, p. 24–34, 7 Jan 2004.

DROBYSHEVSKY, Alexander e colab. **Sensory deficits and olfactory system injury detected by novel application of MEMRI in newborn rabbit after antenatal hypoxia–ischemia.** NeuroImage, v. 32, n. 3, p. 1106–1112, Set 2006.

FEDRIZZI, E e colab. **Hand function in children with hemiplegic cerebral palsy: prospective follow-up and functional outcome in adolescence.** Dev Med Child Neurol; 45: 85–91, 2003.

FERNSTROM, J D. **Effects of the diet and other metabolic phenomena on brain tryptophan uptake and serotonin synthesis.** Advances in experimental medicine and biology, v. 294, p. 369–76, 1991.

FERRAZ-PEREIRA KN e TOSCANO AE e MANHÃES-DE-CASTRO R. **Effect of early undernutrition on masticatory morphophysiology: review of the literature.** Arch Oral Biol. 58 (11): 1735-43. 2013.

FERRAZ-PEREIRA, KN e colab. **Neonatal low-protein diet reduces the masticatory efficiency in rats.** The British journal of nutrition.114(9):1515-30. 2015.

FLETT PJ. **Rehabilitation of spasticity and related problems in childhood cerebral palsy.** J Paediatr Child Health. 39: 6–14, 2003.

GALINDO, LC e colab. **Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats.** Int J dev Neurosci. 46:76-81. 2015.

GALLI C e MACALUSO G e PASSERI G. **Serotonin: a novel bone mass controller may have implications for alveolar bone.** Journal of negative results in biomedicine.12:12. 2013.

GLUCKMAN, Peter D. e HANSON, Mark A. e BEEDLE, Alan S. **Early life events and their consequences for later disease: A life history and evolutionary perspective.** American Journal of Human Biology, v. 19, n. 1, p. 1–19, Jan 2007.

GOLDSTEIN, EM. **Spasticity management: an overview.** J Child Neurol; 16: 16–23, 2001.

HAIDER S e KHALIQ S e HALEEN DJ. **Enhanced serotonergic neurotransmission in the hippocampus following tryptophan administration improves learning acquisition and memory consolidation in rats.** Pharmacological reports: PR.;59(1):53-7. 2007.

HALES, C.N. **Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance in adulthood: the “thrifty phenotype” hypothesis revisited.** Acta Paediatr Suppl, 422, 73-77, jul, 1997.

HALLAL, Pedro C e colab. **Infancy and childhood growth and physical activity in adolescence: prospective birth cohort study from Brazil.** International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity, v. 9, n. 1, p. 82, 2 Jul 2012.

HO, C.Y e BERRIDGE, K.C. **Excessive disgust caused by brain lesions or temporary inactivations: mapping hotspots of the nucleus accumbens and ventral pallidum.** Eur J Neurosci, 40, 10, 3556-3572, Nov 2014.

HSIAO, C F e colab. **Multiple effects of serotonin on membrane properties of trigeminal motoneurons in vitro.** Journal of neurophysiology, v. 77, n. 6, p. 2910–24, Jun 1997.

HSIAO, CF e colab. **Development and serotonergic modulation of NMDA bursting in rat trigeminal motoneurons.** Journal of neurophysiology.87(3):1318-28. 2002.

ISHIDA T e YABUSHITA T e ONO T. **Functional reversibility of temporomandibular joint mechanoreceptors.** Arch Oral Biol. 58(9):1078-83. Sep 2013.

JABER, Luc e colab. **A Physiologic Role for Serotonergic Transmission in Adult Rat Taste Buds.** PLoS ONE, v. 9, n. 11, p. e112152, 11 Nov 2014.

JOHNSTON, Michael V. e colab. **Models of Cerebral Palsy.** Journal of Child Neurology, v. 20, n. 12, p. 984–987, 2 Dez 2005.

KANNAN, Sujatha e colab. **Decreased Cortical Serotonin in Neonatal Rabbits Exposed to Endotoxin *in Utero*.** Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, v. 31, n. 2, p. 738–749, 8 Feb 2011.

KAWAI, N e colab. **Functional characteristics of the rat jaw muscles: daily muscle activity and fiber type composition.** Journal of anatomy. 215(6):656-62. 2009.

KILKENNY, C e colab. **Editorial: Animal research: Reporting in vivo experiments- The ARRIVE Guidelines.** J Cereb Blood Flow Metab. 31 (4): 991-3. 2011.

KOLTAA e DUBUC R e LUND JP. **An immunocytochemical and autoradiographic investigation of the serotonergic innervation of trigeminal mesencephalic and motor nuclei in the rabbit.** Neuroscience. 53(4):1113-26. 1993.

KOLTA, A e colab. **Modulation of rhythmogenic properties of trigeminal neurons contributing to the masticatory CPG.** Prog Brain Res..187:137-48. 2010.

KOMAN, LA e SMITH, B.O e SHILT, J.S. **Cerebral palsy.** Lancet, 363, 9421, 1619-1631, Mai 15, 2004

KRIGGER, KW. **Cerebral palsy: an overview.** Am Fam Physician.73:91-100, 2006.

KUPERMINC , M.N e STEVENSON, R.D. **Growth and nutrition disorders in children with cerebral palsy.** Dev Disabil Res Rev, 14,2,137-146, 2008.

KURASAWA I e TODA K e NAKANURA Y. **Non-reciprocal facilitation of trigeminal motoneurons innervating jaw-closing and jaw-opening muscles induced by iontophoretic application of serotonin in the guinea pig.** Brain research. 515(1-2):126-34.1990.

LACERDA, D. C. e colab. **Oro-facial functions in experimental models of cerebral palsy: a systematic review.** Journal of Oral Rehabilitation, v. 44, n. 4, p. 251–260, Abr 2017.

LACERDA, D.C e colab. **Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats.** Physiology & Behavior, v. 173, p. 69–78, 1 Maio 2017.

LACERDA, DC e colab. **Does L-Tryptophan supplementation reduce chewing deficits in an experimental model of cerebral palsy?** Nutr Neurosci. 8305(October):1–2. 2017.

LANGENBACH GE, e colab. **Is fiber-type composition related to daily jaw muscle activity during postnatal development?** Cells Tissues Organs. 187(4):307-15. 2008.

MANCINI, M. C e colab. **[Comparison of functional activity performance in normally developing children and children with cerebral palsy].** Arq Neuropsiquiatr, 60, 2-B, 446-452, Jun, 2002.

MARCUZZO, S e colab. **Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: walking pattern and soleus quantitative histology.** Brain research;1222:129-40. 2008.

MATEOS, Soledad Sánchez e colab. **Circadian Levels of Serotonin in Plasma and Brain after Oral Administration of Tryptophan in Rats.** Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, v. 104, n. 1, p. 52–59, Jan 2009.

MOISEIWITSCH, JR. **The role of serotonin and neurotransmitters during craniofacial development.** Crit Rev Oral Biol Med. 11(2):230-9.2000.

MORGANE, Peter J e MOKLER, David J e GALLER, Janina R. **Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation.** Neuroscience and biobehavioral reviews, v. 26, n. 4, p. 471–83, Jun 2002.

MORRIS, P e colab. **Food intake and selection after peripheral tryptophan.** Physiol Behav. 40 (2): 155-63. 1987.

MOSTAFEEZUR, RM e colab. **Cannabinoids facilitate the swallowing reflex elicited by the superior laryngeal nerve stimulation in rats.** PloS One, 7,11, e50703, 2012.

NG, DV e colab. **How close are we to achieving energy and nutrients goals for very low birth weight infants in the first week?** JPEN J Parenter Enteral Nutr. 41 (3): 500-506. 2017.

ORTEGA, A. O. L. e colab. **Frequency of temporomandibular disorder signs in individuals with cerebral palsy.** Journal of Oral Rehabilitation, v. 35, n. 3, p. 191–195, Mar 2008.

OZANNE, Susan E. e HALES, C. Nicholas. **Lifespan: Catch-up growth and obesity in male mice.** Nature, v. 427, n. 6973, p. 411–412, 29 Jan 2004.

PERILLAN, C e colab. **Maternal RAS influence on the ontogeny of thirst.** Physiol Behav. ;92(4):554–9. 2007.

PINTO, CB e colab. **SSRI and motor recovery in stroke: reestablishment of inhibitory neural network tonus.** Front Neurosci. 1-10. 11(Nov), 2017.

REINEBRANT, Hanna E. e colab. **Differential effects of neonatal hypoxic–ischemic brain injury on brainstem serotonergic raphe nuclei.** Brain Research, v. 1322, p. 124–133, 31 Mar 2010.

REINEBRANT, Hanna E. e WIXEY, Julie A. e BULLER, Kathryn M. **Disruption of raphé serotonergic neural projections to the cortex: a potential pathway contributing to remote loss of brainstem neurons following neonatal hypoxic–ischemic brain injury.** European Journal of Neuroscience, v. 36, n. 11, p. 3483–3491, Dez 2012.

REINEBRANT, H.E. e WIXEY, J.A. e BULLER, K.M. **Neonatal hypoxia–ischaemia disrupts descending neural inputs to dorsal raphé nuclei.** Neuroscience, v. 248, p. 427–435, 17 Set 2013.

REN, Y e colab. **Immunocytochemical localization of serotonin and serotonin transporter (SET) in taste buds of rat.** Brain research. Molecular brain research, v. 74, n. 1–2, p. 221–4, 10 Dez 1999.

RUDDICK, J.P e colab. **Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications.** Expert Rev Mol Med, 8, 20, 1-27, Aug, 2006.

SANGER, T.D e colab. **Classification and definition of disorders causing**

**hypertonia in childhood.** Pediatrics; 111: e89–97, 2003.

SANGERMANO M, D'Aniello R e colab. **Nutritional problems in children with neuromotor disabilities: an Italian case series.** Ital J Pediatr. 8;40:61, Jul, 2014.

SANTOS MT e colab. **Oral motor performance in spastic cerebral palsy individuals: are hydration and nutritional status associated?** J Oral Pathol Med. ;41(2):153-7. Feb, 2012.

SCHIFFMAN, SS. **Critical illness and changes in sensory perception.** Proc Nutr Soc. 66(3):331-45. Aug, 2007.

SEREL Arslan S e colab. **The severity of chewing disorders is related to gross motor function and trunk control in children with cerebral palsy.** Somatosens Mot Res. 35(3-4):178-182. 2018.

SHIBATA, M. **[Influence of a liquid diet on the jaw-closing muscle spindles in growing rats].** Kokubyo Gakkai Zasshi, 77, 1, 53-58, Mar 2010.

SILVA, Kássia Oliveira Gomes Da e colab. **Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy.** International Journal of Developmental Neuroscience, v. 52, p. 38–45, Ago 2016.

SILVA, LUANA C.A. e colab. **Tryptophan overloading activates brain regions involved with cognition, mood and anxiety.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 89, n. 1, p. 273–283, Mar 2017.

SMOTHERMAN, W P e ROBINSON, S R. **Milk as the proximal mechanism for behavioral change in the newborn.** Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992). Supplement, v. 397, p. 64–70, Jun 1994.

STEPHENS, BE e colab. **First-week protein and energy intakes are associated with 18-month developmental outcomes in extremely low birth infants.** Pediatrics. 123 (5):1337-43. 2009.

STIGGER, F e colab. **Treadmill training induces plasticity in spinal motoneurons and sciatic nerve after sensorimotor restriction during early postnatal period: new insights into the clinical approach for children with cerebral palsy.** International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience. 29(8):833-8. 2011.

STRATA, F e colab. **Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: implications for a rodent model of cerebral palsy.** Neuroscience, 129, 1, 141-156, 2004.

SULLIVAN, P B e colab. **Prevalence and severity of feeding and nutritional problems in children with neurological impairment: Oxford Feeding Study.** Developmental medicine and child neurology, v. 42, n. 10, p. 674–80, Out 2000.

SULLIVAN, P. B. **Nutrition and growth in children with cerebral palsy: setting the**

**scene.** Eur J Clin Nutr, 67 Supply 2, S3-4, Dec, 2013.

TAN, Sidhartha e colab. **Model of Cerebral Palsy in the Perinatal Rabbit.** Journal of Child Neurology, v. 20, n. 12, p. 972–979, 2 Dez 2005.

THOMAS, JM e colab. **The 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) reduces palatable food consumption and BOLD fMRI responses to food images in healthy female volunteers.** Psychopharmacology (Berl). 235 (1): 257-267. 2018.

TOSCANO, AE e colab. **Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats.** Nutrition. 24 (3):270-8. 2008.

TOTH, M.J e POEHLMAN, E.T. **Energetic adaptation to chronic disease in the elderly.** Nutr Rev, 58, 3 Pt 1, 61-66, Mar 2000.

TRULSON ME e TRULSON VM. **Effects of chronic methamphetamine administration on tryptophan hydroxylase activity, [3H]serotonin synaptosomal uptake, and serotonin metabolism in rat brain following systemic tryptophan loading.** Neuropharmacology. 21(6):521-7. Jun 1982.

VASILEV DS e colab. **Prenatal Hypoxia in Different Periods of Embryogenesis Differentially Affects Cell Migration, Neuronal Plasticity, and Rat Behavior in Postnatal Ontogenesis.** Frontiers in neuroscience.10:126. 2016.

WEST-EBERHARD, M J. **Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review).** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 83, n. 5, p. 1388–92, Mar 1986.

WESTNEAT, M W e HALL, W G. **Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: an electromyographic analysis of suckling and chewing.** Behavioral neuroscience, v. 106, n. 3, p. 539–54, Jun 1992.

WILLIAMS, M e colab. **Maternal Inflammation Results in Altered Tryptophan Metabolism in Rabbit Placenta and Fetal Brain.** Developmental neuroscience. 39(5):399-412. 2017.

WIXEY, Julie A. e REINEBRANT, Hanna E. e BULLER, Kathryn M. **Inhibition of Neuroinflammation Prevents Injury to the Serotonergic Network After Hypoxia-Ischemia in the Immature Rat Brain.** Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, v. 70, n. 1, p. 23–35, 1 Jan 2011.

YAMADA, Y e YAKAMURA, K e INOUE, M. **Coordination of cranial motoneurons during mastication.** Respir Physiol Neurobiol, 147, 2-3, 177-189, Jul 2005.

YAO, K e colab **Tryptophan metabolism in animals: important roles in nutrition and health.** Frontiers in bioscience. 2011;3:286-97.

YOUNG, S.N. **The effect of raising and lowering tryptophan levels on human mood and social behavior.** Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 368, 1615, 20110375,

2013.

**ZHANG, Z e colab. Traumatic Injury Leads to Inflammation and Altered Tryptophan Metabolism in the Juvenile Rabbit Brain. J Neurotrauma. Sep 11, 2018.**

**ZHU, Y e HSU, W. H e HOLLIS, J. H. Increasing the number of masticatory cycles is associated with reduced appetite and altered postprandial plasma concentrations of gut hormones, insulin and glucose. Br J Nutr, 110,2, 384-390, Jul 2013.**

**APÊNDICE A- ARTIGO ORIGINAL (NUTRITIONAL NEUROSCIENCE)****Treatment with the essential amino acid L-tryptophan reduces masticatory impairments in experimental cerebral palsy**

Diego Cabral Lacerda<sup>a</sup>, Raul Manhães-de-Castro<sup>b</sup>, Henrique José Cavalcanti Bezerra Gouveia<sup>a</sup>, Yves Tourneur<sup>c</sup>, Barbara Juacy Costa de Santana<sup>d</sup>, Renata Emmanuele Assunção Santos<sup>a</sup>, Jacques Olivier-Coq<sup>e</sup>, Kelli Nogueira Ferraz-Pereira<sup>f</sup> & Ana Elisa Toscano<sup>g\*</sup>.

<sup>a</sup>Post Graduate Program in Nutrition, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

<sup>b</sup>Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

<sup>c</sup>CNRS, Unité INSERM Carmem, Lyon, France

<sup>d</sup>Post Graduate Program in Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Federal University of Pernambuco, 50670-901 Recife, PE, Brazil

<sup>e</sup>Institut de Neurosciences de la Timone (INT), UMR 7289, CNRS Aix Marseille Université, Marseille, France

<sup>f</sup>Department of Physical Education and Sports Sciences, CAV, Federal University of Pernambuco, 55608-680 Recife, PE, Brazil

<sup>g</sup>Department of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, 55608-680 Recife, PE, Brazil

**\*Address of corresponding author:**

Ana Elisa Toscano

Department of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco (UFPE) - Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, 55608-680 – Vitória de Santo Antão - PE, Brazil.

Telephone: +55 (081) 35233351. Email: [aeltoscano@yahoo.com](mailto:aeltoscano@yahoo.com).

## ABSTRACT

**Purpose** Children with cerebral palsy (CP) often exhibit difficulties in feeding resulting from deficits in chewing. This study investigates the therapeutic potential of L-tryptophan (TRI) to reduce deficits in chewing in rats subjected to an experimental model of CP.

**Methods** A total of 80 Wistar albino rats were used. Pups were randomly assigned to 4 experimental groups: Control Saline, Control TRI, CP Saline, and CP TRI groups. The experimental model of CP was based on the combination of perinatal anoxia associated with postnatal sensorimotor restriction of the hind limbs. TRI was administered subcutaneously during the lactation period. Anatomical and behavioral parameters were evaluated during maturation, including body weight gain, food intake, chewing movements, relative weight and the distribution of the types of masseter muscle fibers.

**Results** The induction of CP limited body weight gain, decreased food intake and led to impairment in the morphological and functional parameters of chewing. Moreover, for a comparable amount of food ingested, CP TRI animals grew the most. In addition, supplementation with TRI improved the number of chewing movements, and increased the weight and proportion of type IIB fibers of the masseter in rats subjected to CP.

**Conclusion** These results demonstrate that experimental CP impaired the development of mastication and that TRI supplementation increased masticatory maturation in animals subjected to CP.

**Keywords:** Cerebral Palsy; Tryptophan; Feeding and Eating Disorders; Chewing; Masseter Muscle.

## INTRODUCTION

Cerebral palsy (CP), the most common physical disability in children, is a group of disorders of movement and posture and of motor function, including spasticity (85-91% of cases), and is caused by a lesion, interference or abnormality that originates in the immature brain<sup>(1)(2)</sup>. On average, 40% of these children present feeding difficulties due to the appearance of orofacial impairments<sup>(3)</sup>. Orofacial impairments include deficits in sucking, mastication, drooling, swallowing, and pharyngeal and esophageal movements<sup>(3)(4)</sup>. In addition, a delay in the maturation of feeding behaviors, characterized by the transition from sucking to chewing, can aggravate the feeding disorder<sup>(4)(5)(6)</sup>. Among the chewing difficulties observed in children with CP, oral motor performance is compromised by decreased activity in muscle contractions due to the weakness of masticatory muscles<sup>(7)</sup>. In addition, atypical coactivations of agonist and antagonist masticatory muscles decrease food grinding in the mouth and lead to poor bolus formation and swallowing difficulties<sup>(8)(9)</sup>. Thus, meals become prolonged, painful and stressful, generating frustrations for parents and especially for children with CP<sup>(10)</sup>.

Rhythmical oral motor activity such as sucking and chewing is under the control of a network of brainstem neurons<sup>(11)</sup>. The regulation of these activities occurs in the brainstem, particularly in the central pattern generators (CPGs)<sup>(12)(13)</sup>. Sucking and chewing CPGs extend from the rostral poles of the trigeminal motor nucleus (TMN) to the rostral pole of the facial nucleus<sup>(12)</sup>. In addition, the maturation of sucking and chewing involves neurotransmitter systems, including serotonin (5-HT)<sup>(14)</sup>. Several studies demonstrate that the serotonergic system is crucial to control TMN activities<sup>(14)(15)(16)</sup>. The TMN receives a dense serotonergic input and contains serotonergic receptors<sup>(14)</sup>, which facilitate the discharges of trigeminal motoneurons. Moreover, 5-HT is involved in the morphogenesis of the craniofacial, dental, bone and muscle structures of the stomatognathic system<sup>(17)(18)</sup>, and all 5-HT receptor subtypes

are expressed in the developing craniofacial structures as well<sup>(18)</sup>. Thus, an intact serotonergic system is necessary for the maturation of the neural structures involved in sucking and chewing.

The development of the serotonergic system appears impaired and disrupted after hypoxia-ischemia in a rat model of CP<sup>20)(21)</sup>. According to these studies, experimental CP leads to a reduction in the 5-HT levels in the brain, and decrease in the quantity and length of serotonergic neurons<sup>20)</sup>The serotonergic system was also affected in many segments of brain, including: somatosensory cortex, primary motor cortex, thalamus, and hypothalamus and around the sucking and chewing CPG areas in the brainstem<sup>20)(21)</sup>. Thus, the serotonergic system appears crucial in the emergence of chewing deficits, as described in experimental models of atypical development of the central nervous system (CNS), such as CP

In a rodent model of CP, we recently showed a reduction in body weight and feeding intake, as well as deficits in the functional and morphological parameters of chewing, compared to control animals<sup>(23)</sup>. Thus, this rodent model appears to replicate some orofacial clinical findings commonly found in children with CP and can also be used to test treatment strategies in reducing chewing damage, in particular 5-HT manipulations<sup>(24)</sup>. In this context, the administration of the precursor essential amino acid L-tryptophan (TRI) is widely used in experimental studies to increase brain levels of 5-HT<sup>(25)</sup>. Experimental CP promoted changes in TRI metabolism, triggering the activation of microglia and excitotoxic lesions that resulted in the production of markers of oxidative damage<sup>(26)(27)</sup>.

Conversely, TRI administration reduced the production of pro-inflammatory cytokines in the cerebral cortex in animals with CP, demonstrating its neuroprotective effect<sup>(28)</sup>. However, the effects of administration of TRI and the increased levels of 5-

HT on the development of masticatory movements and the phenotype of chewing muscles remain unclear, especially in the case of CP. Thus, we hypothesized that supplementation with TRI increases CNS levels of 5-HT, which restores serotonergic activity in sucking and chewing CPGs, leading to an increase in the quantity and quality of sucking and chewing movements and thus enhancing body weight in an experimental CP model. To further explore our hypothesis, we evaluated the effects of TRI treatment on the chewing parameters in animals subjected to CP. Encouraging findings have shown that the manipulation of the serotonergic system has been used for the treatment of depression and stroke disease, suggesting the possibility of similar improvements in CP<sup>(29)(30)</sup>. Therefore, a possible increase in serotonergic activity induced by postnatal therapy with its precursor amino acid may improve masticatory maturation in animals subjected to CP and contribute to the inclusion of therapeutic nutritional strategies in attenuating the chewing impairments observed in children affected by CP.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

A total of 80 Wistar albino rats were obtained from 15 litters in the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Brazil. In each litter, animals were randomly assigned to 4 experimental groups according to CP induction and TRI administration: Control Saline (n = 25); Control TRI (n = 16); CP Saline (n = 23); and CP TRI (n= 16) group. The litters used to compose the experimental groups were standardized, containing 8 pups in each litter, and only male rats were used for experimental analysis. The pups received TRI (dose of 50 mg/kg, Control TRI and CP

TRI) or saline solution (NaCl 0.9%, Control Saline and CP Saline) subcutaneously during lactation, daily starting at postnatal day 1 (P1) until P21. According to a recent systematic review, this dose of TRI supplementation seems to be an efficient method to increase brain levels of 5-HT<sup>25</sup>. Moreover, we administered TRI at the beginning of the dark cycle, since it corresponds to a peak of expression of 5-HT in many segments of the CNS<sup>(31)</sup>. All rats were kept in an inverted cycle of 12/12h at a temperature of 22 ± 1°C and fed standard chow *ad libitum* (53.59g/100g carbohydrate, 25.51g/100g protein and 4.51g/100g lipids and 354.65 Kcal/100g) Presence®. The diet used contains on average 0.96mg/kg of TRI, based on previous studies which describes the composition and the content of TRI in animal diet<sup>(32)(33)</sup>.

All experiments and animal use were carried out in accordance with the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) Guidelines<sup>(34)</sup> and with the guidelines laid down by NIH (NIH Publication #80-23) and EC Council Directive (2007/526/EEC). This study was approved by the ethics committee for animal use of the Federal University of Pernambuco (#0050/2016; approved in July 2016).

### **Experimental Model of CP**

The experimental model of CP was based on the combination of neonatal anoxia with movement deprivation of the hind limbs, which corresponds to a sensorimotor restriction (SMR), as described earlier<sup>(35)(36)(37)(38)</sup>. First, the pups were subjected to two episodes of anoxia at P0 and P1. The rats were placed inside a glass chamber partially immersed in water at 37°C and exposed to nitrogen (100%) at 9 L/min for 12 minutes each time. From P2 to P28, the sensorimotor restriction of the hind paws was performed for 16 hours per day. During SMR, only limited movements of the hip joint were allowed, leaving the hind limbs extended in the epoxy mold (Poly

Epox, Pulvitec). The elimination of urine and stools and maternal care was not impaired during SMR.

### **Measurement of Body Weight**

To evaluate the effects of CP induction and neonatal treatment with TRI on the physical development of animals, their body weight was measured at several postnatal days (P1, P8, P14, P21 and P29) using a digital electronic scale (Marte, BL3200H model, capacity of 3.2 kg and sensitivity of 0.1 g).

### **Analysis of Food Intake**

Feeding intake by sucking milk was evaluated during lactation following the methods described by Perillan et al. 2007<sup>(39)</sup>. First, pups were separated from their mothers for 2 hours and kept in a heated box containing wood shavings. Then, pups were returned to their mothers for 1 hour to evaluate milk intake. Body weight was precisely measured 2 h after mother separation and 1 h after return to the mother. The difference in body weight obtained between the 2 measurements was used to determine the feeding intake in the first (W1, at P7/P8), second (W2, at P14/P15) and third (W3, at P19/P20) weeks of postnatal life. In addition, we measured the food intake by chewing in the third (W3, at P21) week of postnatal life<sup>(23)</sup> to quantify the amount of food ingested by chewing after the regression of sucking behavior. In addition, we verified the relative food intake by sucking and chewing (quotient between food intake by body weight x 100). The analysis of food intake by sucking and chewing was performed using a precision balance (*Shimadzu* model, capacity of 220 g, and sensitivity of 0.01 g).

### **Chewing Movements**

The motor parameters of chewing were evaluated at P21, as previously described by Ferraz-Pereira et al. (2015)<sup>(40)</sup> and Lacerda et al. (2017)<sup>(23)</sup>. First, the

animals were food-deprived for 3 hours. Then, the chewing movements of each animal were videotaped and analyzed offline. The following parameters were evaluated: the duration of the rhythmic chewing phase (s), the number of chewing cycles (n) and the frequency of chewing cycles (Hz). The rhythmic chewing phase is the period in which the animal performed vertical and regular movements of the mandible (chewing cycles) to grind and pulverize the food pellets (circular pellets, *Presence Rats and Mice*) between the upper and lower jaws. The frequency of chewing cycles corresponds to the number of chewing cycles performed during the rhythmic chewing phase.

### **Phenotype of the Masseter Muscle**

The animals were sacrificed by decapitation to dissect the superficial bundle of the masseter muscle at P29. After dissection, the muscle was immediately weighed and immersed in frozen n-hexane. The muscles were stored at -80°C and subsequently evaluated for the proportion of different types of muscle fibers. Cross-sections (10 µm) were obtained using a cryostat maintained at a temperature of -20°C. The transverse sections were fixed on transparent microscope slides at room temperature. Afterward, histochemical analysis was performed according to the method proposed by Brooke and Kaiser (1970)<sup>(41)</sup>. This technique allows the identification of different types of muscle fibers according to the intensity of the ATPase enzyme reaction after preincubation in acidic medium (pH 4.7). The following types of muscle fibers were analyzed: type I fibers (oxidative, tonic and resistant to fatigue, reacts with maximum intensity with the ATPase enzyme, stained black); type IIA fibers (glycolytic, phasic, intermediate characteristic, reacts minimally with the enzyme ATPase, remains clear) and type IIB fibers (glycolytic, phasic, explosive muscular contraction, reacts in an intermediate way with the enzyme ATPase, stained gray). Images were captured with the 40x objective of an optical microscope. To determine

the proportions of muscle fibers, the program Mensurin-PRO version 3.2 software (Jean-François Mother, Amiens, France) was used for counting the cells. This analysis was performed to assess how muscle properties could be affected by the induction of the experimental CP, as well as to evaluate the therapeutic potential of L-TRI. In addition, the masseter muscle was chosen because it plays an important role in the execution of the chewing strokes and movements performed for grinding the food.

### **Statistical Analysis**

Data analysis and statistics were performed using R (The R Foundation for Statistical Computing, Institute for Statistics and Mathematics, Wien, Austria). The results were expressed as the mean  $\pm$  standard error of the mean and analyzed by two-way ANOVA repeated measures and Tukey *post hoc* tests for analysis of body weight and food intake and two-way ANOVA and Tukey *post hoc* tests for the other parameters. To assess possible relationships between sets of variables within the same animals, we used principal components analysis (PCA) to reduce high dimensionality. PCA is defined as an orthogonal linear transformation of the dataset into a reduced subspace with new coordinates so that the variance is maximized on each new coordinate axis or principal component, thus minimizing the loss of information. A normalization method, based on data mean adjustment to 0 and standard deviation (SD) adjustment to 1, was applied to allow comparisons of data with disparate values and variances. PCA was performed on 3 sets of variables, including 1) body weight during 5 time periods of body weight measurement (P1, P8, P14, P21 and P29), 2) feeding intake with 4 variables (sucking in week 1, sucking in week 2, sucking in week 3, chewing in week 3), and 3) chewing movements composed of 3 variables (rhythmic chewing phase, number of chewing cycles, frequency of chewing cycles). We thus obtained a score for each rat and for each set of variables along the

PC1 or x-axis that optimally differentiated the different groups of animals. The aim was to correlate the scores of each rat between the 3 variables, i.e., the scores that optimally characterized each animal for a given set of variables. We used these optimal scores to perform subsequent ANOVA between all 4 groups and linear correlations (Pearson or Spearman correlations according to data normality) within the same animals by using R.

## RESULTS

### Body Weight

Body weight in both control groups gradually increased from P1 to P29 [ $F(4,375) = 1201.9$ ;  $p < 0.0001$ ] without significant differences between the 2 control groups treated with either saline or TRI (Tukey *post hoc* test:  $P$ : n.s.; Fig. 1). Compared to the 2 groups of control rats, the body weight of CP rats with either saline or TRI was significantly smaller at P14, P21 and P29 [ $F(3,375) = 75.1$ ;  $P < 0.001$ ], but both CP groups did not differ (Tukey *post hoc* test:  $P$ : n.s.), suggesting an impact of CP treatment and no effect of TRI on body weight gain (Fig. 1). In addition, we found an interaction between the time period and groups, suggesting that the body weight of Control and CP rats increased differentially over time [ $F(12,375) = 16.5$ ;  $P < 0.0001$ ].

### Analysis of Food Intake

Using PCA to compute individual scores along PC1 from the 4 variables dealing with the amount of food intake [ $F(3,60) = 4.83$ ;  $P < 0.005$ ], the scores of Control Saline rats ( $0.8 \pm 0.4$ ) did not differ from Control TRI rats ( $0.5 \pm 0.3$ ), and CP Saline rats ( $-0.9 \pm 0.3$ ) did not differ from CP TRI rats ( $-0.5 \pm 0.3$ ; Tukey *post hoc* tests:  $P$ : n.s.). In addition, the scores of Control rats with either treatment differed from those of CP rats with either treatment, suggesting an impact of CP on food intake by sucking and chewing (Tukey *post hoc* test  $P < 0.01$ ; Fig. 2A) but no specific impact of TRI.

More precisely, the food intake by sucking in both control groups increased from week 1 to week 3 [ $F(3,188) = 49.9$ ;  $P < 0.0001$ ] without significant differences from week 1 to week 2 (Tukey *post hoc* test:  $P$ : n.s.; Fig. 2B). In week 3 [ $F(3,188) = 2.76$ ;  $P < 0.05$ ]. Milk intake was statistically reduced only in CP Saline rats compared to Control Saline rats (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig. 2B). We found no interaction between periods and groups [ $F(9,188) = 1.0$ ;  $P$ : n.s.]. Thus, the induction of CP promoted a specific negative impact on milk intake in week 3; however, the milk intake did not differ between Control TRI and CP TRI rats. Regarding food intake by chewing in week 3 [ $F(3,60) = 4.83$ ,  $P < 0.05$ ], we found a reduction in the number of food pellets eaten by CP TRI rats compared to that eaten by Control TRI rats (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig. 2B), while no significant changes were observed between other groups. Based on relative food intake by sucking and chewing, CP Saline animals showed a reduction on food intake by sucking in week 3 (P19-P20), compared with Control Saline rats (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig. 2B). An increase on food intake by sucking in week 3 was verified in CP TRI rats compared with CP Saline animals (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig. 2B).

To gain details about the impact of CP and TRI treatment, we evaluated the Pearson correlations between body weight and food intake by sucking and chewing in each experimental group. We found a moderate correlation between these variables in Control Saline ( $r = 0.57$ ,  $P < 0.05$ ), Control TRI ( $r = 0.69$ ,  $P < 0.05$ ), and CP Saline rats ( $r = 0.67$ ,  $P < 0.05$ ). Interestingly, the combination of CP and TRI showed the highest correlation ( $0.89$ ,  $P < 0.0001$ ) in the CP TRI group, showing that for a comparable amount of food ingested, CP TRI animals grew the most. To complete this analysis on the impact of treatments with CP and TRI, we evaluated the execution of chewing movements.

## Chewing Movements

Based on PCA computed with 3 variables characterizing chewing movements, ANOVA [ $F(3,36) = 36.94$ ;  $P < 0.0001$ ] showed that the scores of CP Saline rats ( $-2.1 \pm 0.3$ ) differed significantly from those of both CP TRI rats ( $-0.3 \pm 0.2$ ) and Control Saline rats ( $0.4 \pm 0.3$ ) along PC1 (Tukey *post hoc* tests:  $P < 0.0001$ ) (Fig. 3A). However, no difference was found between CP TRI and Control Saline rats (Tukey *post hoc* test:  $P = 0.24$ , n.s.), while Control TRI animals ( $2.0 \pm 0.2$ ) differed from Control Saline animals (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.0001$ ; Fig. 3A). These results suggest that treatment with TRI attenuated the deleterious impact of CP on chewing movements.

To better understand the effect of CP and TRI, we analyzed specific parameters of chewing at P21. First, both CP groups had a reduced duration of rhythmic chewing phase compared to their Control groups (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig. 3B) [ $F(3,36) = 10.31$ ;  $P < 0.0001$ ]. Second, CP TRI rats showed a tendency for fewer chewing cycles compared to Control TRI rats (Tukey *post hoc* test:  $P = 0.07$ ; Fig. 3C) [ $F(3,36) = 3.733$ ;  $P < 0.05$ ]. Finally, ANOVA [ $F(3,36) = 10.73$ ;  $P < 0.0001$ ] showed that CP Saline rats exhibited a lower frequency of chewing cycles than both Control Saline rats and CP TRI rats (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.05$ ), yet Control and CP rats treated with TRI did not differ (Tukey *post hoc* test:  $P$ : n.s.; Fig. 3D). These results suggest that CP impaired chewing efficiency, while treatment with TRI attenuated the deleterious impact of CP.

## Phenotype of the Masseter Muscle

The relative weight of the masseter in CP rats with either treatment was significantly smaller (Tukey *post hoc* tests:  $p < 0.001$ ; Fig. 4A) than that of control rats treated either with saline or TRI [ $F(3,16) = 133$ ;  $p < 0.0001$ ]. Conversely, the relative weight of the masseter was higher in both groups treated with TRI compared with their respective Saline groups, and this relative weight was higher in CP TRI rats than in CP

Saline rats (Tukey *post hoc* tests:  $P < 0.001$ ), suggestive of a partial recovery of the weight of the masseter after TRI treatment (Fig. 4A).

We also evaluated the proportion of different fiber types in the masseter at P29 (Fig. 4 C). Both CP groups showed an increase in the percentage of type IIA fibers [ $F(3,16) = 15.5$ ;  $P < 0.0001$ ] associated with a decrease in type IIB fibers [ $F(3,16) = 13.8$ ;  $P < 0.0001$ ] compared to their respective Control groups (Tukey *post hoc* tests:  $P < 0.05$ ) (Fig. 4B). Interestingly, treatment with TRI in both Control and CP rats promoted the opposite effect (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.05$ ), suggesting that TRI therapy partially reversed the adverse effect on the phenotype of the masseter after CP treatment (Figure 4 B, C).

### **Functional Relationships Between Specific Variables Using PCA**

To evaluate the relationships between specific variables, individual scores for each rat in 3 sets of variables were computed using PCA. We found moderate but significant correlations between functional (the number of chewing cycles and the frequency of chewing cycles) and morphological (relative weight, proportion of type IIA and IIB fibers of the masseter muscle) parameters (Table 1). According to Table 1, the greater the relative weight and proportions of type IIB fibers, the greater the numbers and the higher the frequency of chewing cycles. Conversely, the greater the proportion of masseter type IIA fibers, the lower the number and frequency of chewing cycles, which means that the increase in the number of chewing movements led to an increase in the proportion of type IIB masseter fibers.

### **DISCUSSION**

We analyzed the effects of experimental CP on body weight, food intake, masticatory movements and the phenotype of the masseter muscle. In addition, this study was the first to evaluate the therapeutic potential of the amino acid TRI in

minimizing chewing deficits in our rat model of CP. Our main findings show that experimental CP leads to the following: 1) a reduction in food intake and body weight during the first weeks of postnatal life; 2) a decrease in the number of chewing movements; and 3) a lower weight and proportion of type IIB fibers of the masseter. Regarding the data obtained from animals subjected to CP and treated with TRI, we found 1) no effect on body weight, but for a comparable amount of food ingested, the CP rats treated with TRI grew the most; 2) an improvement in the number of chewing movements; and 3) increases in weight and the proportion of type IIB fibers of the masseter. These findings demonstrated that nutritional manipulation by TRI administration may contribute to reducing chewing deficits in rats with experimental CP.

### **Body Weight**

Experimental CP limited body weight gain when compared to Control animals. These data corroborate the findings obtained in studies that evaluated the same experimental model of CP and observed a similar reduction in body weight<sup>(23)(37)</sup>. The impact on body weight gain may be related to the motor damage produced by SMR during development. First, SMR rats developed locomotion deficits and a spasticity of the leg muscles<sup>(35)(37)(38)</sup>. Second, SMR replicates deficits in sucking and chewing movements and decreases food intake<sup>(23)</sup>. Thus, our results may be explained by the capacity of SMR to induce locomotion problems<sup>(37)(38)</sup>, sucking and chewing deficits and a reduction in food intake<sup>(23)</sup>.

The absence of effects on body weight after TRI supplementation is corroborated by a previous study in which no difference in body weight evaluated at similar ages was found in Wistar rats treated with a TRI-enriched diet during the first month of life<sup>(42)</sup>. We did not observe changes in body weight after the administration of TRI. However, we found a high correlation between body weight and food intake in CP

animals treated with TRI. Our results showed that for a comparable amount of food ingested, CP TRI animals grew the most. Therefore, we suggested that TRI supplementation increases somatic development through feeding intake stimulation<sup>(43)</sup>.

### **Food Intake**

We found a reduction in food intake by sucking in animals subjected to CP compared to control animals injected with saline. This effect may be related to an incoordination of sucking and swallowing<sup>(44)(45)</sup>, a reduction in tactile perception through rat vibrissae<sup>(46)</sup> and disorganized cortical somatosensory maps<sup>(36)</sup> in previous studies with experimental models of CP<sup>(44)</sup>. Thus, it is suggested that the reduction in maternal milk intake found in the present study may result from difficulties in the animal's perception of the maternal nipple.

The milk intake did not differ between Control TRI and CP TRI rats at any age evaluated. CP TRI animals also presented a reduction in food intake by chewing compared to Control TRI rats. However, it is important to highlight that the administration of TRI improved feeding efficiency (more weight gain for the same food intake). Under normal conditions, the maternal milk of rats is composed on average of 11 g/dl of protein content and 0.29-0.39g/dl of TRI content<sup>(47)</sup>. Regarding TRI therapy, we estimate how much the supplementation of this amino acid contributed to the total intake of protein and TRI during lactation period, on first week (Control TRI: 2.72%, 48.38%; CP TRI: 2.07%, 42.16%), second week (Control TRI: 2.07%, 42.16%; CP TRI: 2.43%, 46.21%) and third week (Control TRI: 1.22%, 29.92%; CP TRI: 1.12%, 28.08%) of postnatal life. In addition, we estimate how much the supplementation with TRI contributed to the total intake of protein and TRI at P21, through chewing movements (Control TRI: 1.13%, 99.96%; CP TRI: 1.16%, 99.96%). This result revealed that almost all TRI was offered by the subcutaneous administration of TRI. Thus, the

increase in feeding efficiency may result from the TRI intake offered by maternal milk together with the TRI supplementation provided by the subcutaneous route during first weeks of postanal life.

According to previous studies, subcutaneous administration of 50 mg/kg of TRI was able to increase the brain levels of 5-HT<sup>(25)</sup>. Humans and experimental evidences demonstrated that 5-HT signaling promoted suppression of food intake<sup>(48)(49)</sup>. Moreover, it has been reported that administration of TRI suppresses total food intake in rats<sup>(50)</sup>. However, the reduction of food intake promoted by TRI supplementation showed minimum effects on protein intake<sup>(50)</sup>. In addition, it's well known that protein intake is critical for the integrity of muscle tissue<sup>(51)</sup>. Thus, we suggested that muscle tissues may be preserved after treatment with TRI.

### **Chewing Movements**

The induction of CP promoted a reduction in mastication efficiency when compared to control animals. Thus, these results suggest that CP treatment reduces the capacity to grind food into small particles and to form a feeding bolus. These data corroborate the study of Lacerda et al. (2017)<sup>(23)</sup>. Our experimental CP model leads to multiple deficits in orofacial functions, including difficulty in manipulating food, a reduction in head movements during feeding, impaired olfactory response and an incoordination of sucking and swallowing<sup>(52)</sup>. As the integrity in chewing movements appears to depend on the maturation of orofacial functions, deficits in some of these functions can lead to overall damage to food behaviors<sup>(53)</sup>. Thus, all of these alterations in orofacial functions may affect chewing performance, as evidenced by the reduction in the time for oral food processing and the decrease in the number of chewing cycles required to pulverize food.

To gain details on mastication efficiency, we evaluated the frequency of chewing cycles and the number of closing and opening jaw movements per second. Animals subjected to experimental CP exhibited a lower frequency of chewing cycles than control groups. In contrast, TRI treatment increased the frequency of chewing cycles in CP animals. Thus, supplementation with TRI increased the frequency of chewing cycles, suggesting greater chewing efficiency in preparing the food for digestion and the subsequent absorption of nutrients. The putative increase in serotonergic activity related to the supplementation with TRI, its precursor amino acid, seems to improve chewing maturation in CP animals<sup>(24)</sup>. The maturation of chewing is gradual and depends on the typical development of the CNS and neurotransmitter systems, including 5-HT<sup>(14)</sup>. Our results may be related to increased levels of 5-HT in the CNS after TRI administration<sup>(24)</sup>. The dose used in our study promotes an increase in 5-HT levels, especially in the brainstem, where sucking and chewing CPGs are located<sup>(25)</sup>. Experimental evidence shows that 5-HT activity promotes an increase in the firing properties of trigeminal neurons<sup>(14)(16)</sup>. According to these studies, elevated levels of 5-HT promote a fast activating and rapid inward current in trigeminal motor neurons. Thus, increased serotonergic activity appears to facilitate the depolarization of trigeminal motor neurons and subsequently increase neural excitability<sup>(14)</sup>. Thus, we suggest that the administration of TRI promotes changes in the electrical properties of the trigeminal nuclei, which may lead to increased jaw movements during chewing.

### **Phenotype of the Masseter Muscle**

The induction of CP promoted a reduction on masseter weight compared to Control animals. This result corroborated our previous study<sup>(23)</sup>. This result may be related to reduction of functional demand of masseter muscle, since animals subjected to CP performed less masticatory movements. Moreover, treatment with TRI increased

masseter weight suggestive of partial recovery of this muscle after nutritional therapy. To complete the evaluation of morphological properties, we investigated the proportions of different masseter fiber types. Animals subjected to CP and treated with saline showed an increase in the proportion of type IIA fibers and a concomitant decrease in the proportion of type IIB fibers compared to the corresponding control group. This result corroborated our previous findings<sup>(23)</sup>. In the first two weeks of typical development, the rat masseter muscle is composed predominantly of type IIA fibers<sup>(54)(55)</sup>. The transition from sucking behavior to chewing movements begins after P12<sup>(54)</sup>. This change in food behavior results in an increase in the proportion of type IIB fibers, since chewing is an activity that requires greater strength, velocity and an explosion of muscle contraction, characteristics of type IIB fibers<sup>(56)(57)</sup>. Thus, the lower proportion of type IIB fibers found after experimental CP suggests a delay in the postnatal maturation of the masseter muscle.

Supplementation with TRI in both groups preserved a higher proportion of type IIB fibers than in the Saline groups. Thus, our results suggest that TRI treatment can decrease the deleterious effect of CP on the masseter muscle and chewing. This effect appears to be related to the critical role of 5-HT in the morphogenesis of craniofacial structures, including the maturation of teeth, the jaw bone and chewing muscles<sup>(17)(18)(58)</sup>. During the typical maturation of food behaviors, 5-HT receptors are expressed early in the developing craniofacial structures<sup>(18)(59)</sup>. Thus, our results highlight that the modulation of 5-HT by TRI therapy may improve the maturation of craniofacial structures after experimental CP, which could reflect the maintenance of a higher proportion of type IIB fibers of the masseter muscle. The correlations between functional and morphological parameters found in the present study revealed that the quality and quantity of chewing movements appear to determine the development of

the morphological aspects of mastication. In addition, we suggest that mechanical stimulation through chewing movements also contributes to the maturation of other structures of the stomatognathic system, including the teeth, jaw bones and temporomandibular joints<sup>(53)(60)</sup>. We also emphasize that mastication movements seem to have high potential for neuroplasticity, which may be reflected by the electrical properties of the trigeminal nuclei<sup>(60)</sup>. Considering that supplementation with TRI led to an increase in the number of chewing movements, we suppose that this treatment is able to improve the development of the components of the craniofacial system during atypical development.

Proper nutrition is essential for craniofacial maturation during critical periods of development (prenatal, birth and first days of postnatal life)<sup>(40)(51)</sup>. In addition, experimental studies demonstrated that protein and amino acid intake during early postnatal period, contribute for development of muscle skeletal tissue<sup>(37)(51)</sup>. Our study did not evaluate the effect of others essential amino acids, which limit the elucidation of the specific role of TRI on chewing maturation. However, since TRI content and 5-HT activity are involved on morphogenesis of masticatory system<sup>(18)(58)(60)</sup>, we suggested that our results may be related to TRI treatment offered for animals subjected to CP.

Thus, the data obtained in our study give new and promising insights into the protective role of TRI in the development of chewing in animals subjected to experimental CP. These data suggest the important role of treatment with TRI as a nutritional intervention in the neonatal intensive care unit (NICU)<sup>(61)</sup>. The milk of mothers who deliver prematurely contains inadequate amounts of nutrients<sup>(62)</sup>. Adequate nutrition during the first postnatal week is associated with the optimal growth and neurodevelopment of children with CP<sup>(61)</sup>. In addition, evidence from human

studies has demonstrated the safety of providing higher levels of amino acids, including TRI<sup>(61)(63)</sup>. Therefore, from these experimental data, we demonstrated the efficacy of therapy with TRI to guarantee the appropriate development of chewing during the breastfeeding period.

## **CONCLUSIONS**

In summary, we investigated the therapeutic potential of TRI in reducing deficits in mastication in experimental CP. From our findings, we confirm our hypothesis that TRI minimizes the appearance of the masticatory impairments observed in CP animals. Thus, our study was the first to evaluate the therapeutic potential of nutrition, particularly treatment with TRI, in attenuating the functional and morphological damage of CP. Therefore, the data obtained in our study may contribute to the inclusion of therapeutic nutritional strategies to attenuate the chewing impairments observed in children affected by CP.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ).

## REFERENCES

1. Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, Goldstein M, Bax M, Damiano D, et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006 Peter Rosenbaum (Definition Panel Chair) MD. *Dev Med Child Neurol.* 2006;49(109):586–600.
2. Morgan P, McGinley JL. Cerebral palsy. *Handb Clin Neurol.* 2018;159(9924):323–36.
3. Sullivan PB. Nutrition and growth in children with cerebral palsy: setting the scene. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67(S2):S3–4.
4. Benfer KA, Weir KA, Bell KL, Ware RS, Davies PSW, Boyd RN. Oropharyngeal dysphagia in preschool children with cerebral palsy: oral phase impairments. *Res Dev Disabil.* 2014;35(12):3469–81.
5. Santos MT, Batista R, Previtali E, Ortega A, Nascimento O, Jardim J. Oral motor performance in spastic cerebral palsy individuals: Are hydration and nutritional status associated? *J Oral Pathol Med.* 2012;41(2):153–7.
6. Serel Arslan S, Demir N, İnal Ö, Karaduman AA. The severity of chewing disorders is related to gross motor function and trunk control in children with cerebral palsy. *Somatosens Mot Res.* 2018;0220:1–5.
7. Botti Rodrigues Santos MT, Cristina Duarte Ferreira M, De Oliveira Guaré R, Sergio Guimarães A, Lira Ortega A. Teeth grinding, oral motor performance and maximal bite force in cerebral palsy children. *Spec Care Dent.* 2015;35(4):170–4.
8. Briesemeister M, Schmidt KC, Ries LGK. Changes in masticatory muscle activity in children with cerebral palsy. *J Electromyogr Kinesiol.* 2013;23(1):260–6.
9. Arvedson JC. Feeding children with cerebral palsy and swallowing difficulties.

- Eur J Clin Nutr. 2013;67(S2):S9–12.
10. Sullivan PB, Lambert B, Rose M, Ford-Adams M, Johnson A, Griffiths P. Prevalence and severity of feeding and nutritional problems in children with neurological impairment: Oxford Feeding Study. *Dev Med Child Neurol*. 2000;42(10):674–80.
  11. Hsiao C-F, Wu N, Levine MS, Chandler SH. Development and serotonergic modulation of NMDA bursting in rat trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol*. 2002;87(3):1318–28.
  12. Kolta A, Morquette P, Lavoie R, Arsenault I, Verdier D. Modulation of rhythmogenic properties of trigeminal neurons contributing to the masticatory CPG. *Prog Brain Res*. 2010;187(C):137–48.
  13. Brocard F, Tazerart S, Vinay L. Do pacemakers drive the central pattern generator for locomotion in mammals? *Neuroscientist*. 2010;16(2):139–55.
  14. Kolta A, Dubuc R, Lund JP. An immunocytochemical and autoradiographic investigation of the serotonergic innervation of trigeminal mesencephalic and motor nuclei in the rabbit. *Neuroscience*. 1993;53(4):1113–26.
  15. Kurasawa I, Toda K, Nakamura Y. Non-reciprocal facilitation of trigeminal motoneurons innervating jaw-closing and jaw-opening muscles induced by iontophoretic application of serotonin in the guinea pig. *Brain Res*. 1990;515(1–2):126–34.
  16. Ribeiro-do-Valle LE. Serotonergic neurons in the caudal raphe nuclei discharge in association with activity of masticatory muscles. *Brazilian J Med Biol Res*. 1997;30(1):79–83.
  17. Jaber L, Zhao FL, Kolli T, Herness S. A physiologic role for serotonergic transmission in adult rat taste buds. *PLoS One*. 2014;9(11).

18. Moiseiwitsch JRD. The Role of Serotonin and Neurotransmitters During Craniofacial Development. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2009;11(2):230–9.
19. Reinebrant HE, Wixey JA, Gobe GC, Colditz PB, Buller KM. Differential effects of neonatal hypoxic-ischemic brain injury on brainstem serotonergic raphe nuclei. *Brain Res*. 2010 Mar 31;1322:124-33.
20. Reinebrant HE, Wixey JA, Buller KM. Neonatal hypoxia-ischaemia disrupts descending neural inputs to dorsal raphé nuclei. *Neuroscience*. 2013 Sep 17;248:427-35.
21. Buller KM, Wixey JA, Reinebrant HE. Disruption of the serotonergic system after neonatal hypoxia-ischemia in a rodent model. *Neurol Res Int*. 2012;2012:650382.
22. Kannan S, Saadani-Makki F, Balakrishnan B, Dai H, Chakraborty PK, Janisse J, et al. Decreased cortical serotonin in neonatal rabbits exposed to endotoxin in utero. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(2):738–49.
23. Lacerda DC, Ferraz-Pereira KN, Visco DB, Pontes PB, Chaves WF, Guzman-Quevedo O, et al. Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats. *Physiol Behav*. 2017;173:69–78.
24. Lacerda DC, Manhães-de-Castro R, Ferraz-Pereira KN, Toscano AE. Does L-Tryptophan supplementation reduce chewing deficits in an experimental model of cerebral palsy? *Nutr Neurosci*. 2017;8305(October):1–2.
25. Carneiro IBC, Toscano AE, Lacerda DC, da Cunha M de SB, de Castro RM, Deiró TCB de J, et al. L-tryptophan administration and increase in cerebral serotonin levels: Systematic review. *Eur J Pharmacol*. 2018;836:129
26. Williams M, Zhang Z, Nance E, Drewes JL, Lesniak WG, Singh S, et al. Maternal Inflammation Results in Altered Tryptophan Metabolism in Rabbit Placenta and

- Fetal Brain. *Dev Neurosci*. 2017;39(5):399–412.
27. Zhang Z, Rasmussen L, Saraswati M, Koehler RC, Robertson C, Kannan S. Traumatic Injury Leads to Inflammation and Altered Tryptophan Metabolism in the Juvenile Rabbit Brain. *J Neurotrauma*. 2018;36(1):74–86.
  28. Del Angel-Meza AR, Dávalos-Marín AJ, Ontiveros-Martinez LL, Ortiz GG, Beas-Zarate C, Chaparro-Huerta V, et al. Protective effects of tryptophan on neuroinflammation in rats after administering lipopolysaccharide. *Biomed Pharmacother*. 2011;65(3):215–9.
  29. Pinto CB, Saleh Velez FG, Lopes F, de Toledo Piza P V., Dipietro L, Wang QM, et al. SSRI and motor recovery in stroke: Reestablishment of inhibitory Neural Network Tonus. *Front Neurosci*. 2017;11(NOV):1–10.
  30. Budhdeo S, Rajapaksa S. Functional recovery in cerebral palsy may be potentiated by administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Med Hypotheses*. 2011;77(3):386–8.
  31. Mateos SS, Sánchez CL, Paredes SD, Barriga C, Rodríguez AB. Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2009;104(1):52–9.
  32. Brumano G, Gomes PC, Rostagno HS, Albino LFT, Schmidt M, et al. Aminoácidos digestíveis verdadeiros de alimentos protéicos determinados em galos cecectomizados. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2006 v.35, n.6, p.2290-2296.
  33. Albino LFT, Rocha Coelho MDG, Rutz F, Brum PAR. Valores energéticos e de triptofano de alguns alimentos determinados, em aves jovens e adultas. *Pesq. Agropec. Bras*. 1987. 22 (11/12): 1301-1306.
  34. Kilkeny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Editorial: Animal research: Reporting in vivo experiments-The ARRIVE Guidelines. *J Cereb Blood*

- Flow Metab. 2011;31(4):991–3.
35. Strata F, Coq JO, Byl N, Merzenich MM. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: Implications for a rodent model of cerebral palsy. *Neuroscience*. 2004;129(1):141–56.
  36. Coq JO, Strata F, Russier M, Safadi FF, Merzenich MM, Byl NN, et al. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: Implications for cerebral palsy. *Exp Neurol*. 2008;210(1):95–108.
  37. Silva KOG da, Pereira S da C, Portovedo M, Milanski M, Galindo LCM, Guzmán-Quevedo O, et al. Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. *Int J Dev Neurosci*. 2016;52:38–45.
  38. Delcour M, Russier M, Castets F, Turle-Lorenzo N, Canu MH, Cayetanot F, et al. Early movement restriction leads to maladaptive plasticity in the sensorimotor cortex and to movement disorders. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–15.
  39. Perillan C, Costales M, Vijande M, Arguelles J. Maternal RAS influence on the ontogeny of thirst. *Physiol Behav*. 2007;92(4):554–9.
  40. Ferraz-Pereira KN, Da Silva Aragão R, Verdier D, Toscano AE, Lacerda DC, Manhães-De-Castro R, et al. Neonatal low-protein diet reduces the masticatory efficiency in rats. *Br J Nutr*. 2015;114(9):1515–30.
  41. Brooke MH, Kaiser KK. Muscle Fiber Types : How Many and what kind. *Arch. Neurol*. 1970; 23 (4): 369-379.
  42. Silva LCA, Viana MB, Andrade JS, Souza MA, Céspedes IC, D’Almeida V. Tryptophan overloading activates brain regions involved with cognition, mood and anxiety. *An Acad Bras Cienc*. 2017;89(1):273–83.

43. Ristine LA, Spear LP. Effects of serotonergic and cholinergic antagonists on suckling behavior of neonatal, infant, and weanling rat pups. *Behav Neural Biol.* 1984;41(2):99–126.
44. Derrick M, Drobyshevsky A, Ji X, Tan S. A model of cerebral palsy from fetal hypoxia-ischemia. *Stroke.* 2007;38(2 PART 2):731–5.
45. Derrick M. Preterm Fetal Hypoxia-Ischemia Causes Hypertonia and Motor Deficits in the Neonatal Rabbit: A Model for Human Cerebral Palsy? *J Neurosci.* 2004;24(1):24–34.
46. Vasilev DS, Dubrovskaya NM, Tumanova NL, Zhuravin IA. Prenatal hypoxia in different periods of embryogenesis differentially affects cell migration, neuronal plasticity, and rat behavior in postnatal ontogenesis. *Front Neurosci.* 2016;10(MAR):1–11.
47. Martin Agnoux A, Antignac JP, Boquien C, David A, Desnots E, Ferchaud-Roucher V, et al. Perinatal protein restriction affects milk free amino acid and fatty acid profile in lactating rats: potential role on pup growth and metabolic status. *J Nutr Biochem.* 2015;26(7):784-95.
48. Galindo LC, Barros Mda L, Pinheiro IL, Santana RV, de Matos RJ, Leandro CG, et al. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. *nt J Dev Neurosci.* 2015;46:76-81.
49. Thomas JM, Dourish CT, Tomlinson J, Hassan-Smith Z, Hansen PC, Higgs S. The 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) reduces palatable food consumption and BOLD fMRI responses to food images in healthy female volunteers. *Psychopharmacology (Berl).* 2018;235(1):257-267.
50. Morris P, Li ET, MacMillan ML, Anderson GH. Food intake and selection after

- peripheral tryptophan. Physiol Behav. 1987;40(2):155-63.
51. Toscano AE, Manhães-de-Castro R, Canon F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. Nutrition. 2008;24(3):270-8.
52. Lacerda DC, Ferraz-Pereira KN, Bezerra de morais AT, Costa-de-santana BJR, Quevedo OG, Manhães-de-Castro R, et al. Oro-facial functions in experimental models of cerebral palsy: a systematic review. J Oral Rehabil. 2017;44(4):251–60.
53. Ferraz-Pereira KN, Toscano AE, Manhães-De-Castro R. Effect of early undernutrition on masticatory morphophysiology: Review of the literature. Arch Oral Biol. 2013;58(11):1735–43.
54. Westneat MW, Hall WG. Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: An electromyographic analysis of suckling and chewing. Behav Neurosci. 1992;106(3):539–54.
55. Langenbach GEJ, Van Wessel T, Brugman P, Korfage JAM, Van Eijden TMGJ. Is fiber-type composition related to daily jaw muscle activity during postnatal development? Cells Tissues Organs. 2008;187(4):307–15.
56. Kawai N, Sano R, Korfage JAM, Nakamura S, Tanaka E, van Wessel T, et al. Functional characteristics of the rat jaw muscles: Daily muscle activity and fiber type composition. J Anat. 2009;215(6):656–62.
57. Sano R, Tanaka E, Korfage JAM, Langenbach GEJ, Kawai N, van Eijden TMGJ, et al. Heterogeneity of fiber characteristics in the rat masseter and digastric muscles. J Anat. 2007;211(4):464–70.
58. Byrd KE, Sheskin TA. Effects of post-natal serotonin levels on craniofacial complex. J Dent Res. 2001;80(8):1730–5.

59. Galli C, Macaluso G, Passeri G. Serotonin: A novel bone mass controller may have implications for alveolar bone. *J Negat Results Biomed*. 2013;12(1):1.
60. Ishida T, Yabushita T, Ono T. Functional reversibility of temporomandibular joint mechanoreceptors. *Arch Oral Biol*. 2013;58(9):1078–83.
61. Ng DV, Brennan-Donnan J, Unger S, Bando N, Gibbins S, Nash A, et al. How Close Are We to Achieving Energy and Nutrient Goals for Very Low Birth Weight Infants in the First Week? *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2017;41(3):500-506.
62. Corvaglia L, Aceti A, Paoletti V, Mariani E, Patrono D, Ancora G, et al. Standard fortification of preterm human milk fails to meet recommended protein intake: Bedside evaluation by Near-Infrared-Reflectance-Analysis. *Early Hum Dev*. 2010 Apr;86(4):237-40.
63. Stephens BE, Walden RV, Gargus RA, Tucker R, McKinley L, Mance M, et al. First-week protein and energy intakes are associated with 18-month developmental outcomes in extremely low birth weight infants. *Pediatrics*. 2009;123(5):1337-43.

## LEGENDS

**Figure 1 Effect of CP and TRI on Body Weight at Postnatal days:** Body weight of rats of the Control Saline (n = 25), Control TRI (n = 16), CP Saline (n = 23), CP TRI (n = 16) groups at 1, 8, 14, 21 and 29 days postnatal life. The body weight of both control groups treated either with saline or TRI increased similarly over time, but was larger than that of CP groups treated either with saline or TRI (\*P <0.001).

**Figure 2 Effect of CP and TRI on Feeding Intake:** (A) PCA Analysis of feeding intake variables (sucking on week 1, sucking on week 2, sucking on week 3, chewing on week 3). CS: Control Saline; CT: Control L-Tryptophan; CPS: Cerebral Palsy Saline; CPTRI: Cerebral Palsy L=Tryptophan. (B) and feeding intake by sucking and chewing and relative food intake of pups from the Control Saline (n = 13), Control TRI (n = 14), CP Saline (n = 13) and CP TRI (n = 11). (A) The scores of PCA analysis of Control Saline rats did not differ from Control TRI rats, as well as CP Saline rats did not differ from CP Tri rats. The scores of Control rats with either treatment differed from those of CP rats with either treatment ( $P < 0.01$ ). (B) In week 3, milk intake was reduced in CP Saline rats, compared to Control Saline rats ( $*P < 0.05$ ). A reduction in the amount of food pellets eaten by CP TRI rats was verified when compared to Control TRI rats ( $*P < 0.05$ ), while no significant changes between other groups. Based on relative food intake by sucking and chewing, CP Saline animals showed a reduction on food intake by sucking in week 3 (P19-P20), compared with Control Saline rats (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig. 2B). An increase on food intake by sucking in week 3 was verified in CPTRI rats compared with CP Saline animals (Tukey *post hoc* test:  $P < 0.05$ ; Fig. 2B).

**Figure 3 Effect of CP and TRI on Chewing Movements:** (A) PCA analysis of chewing movements composed by 3 variables (rhythmic chewing phase, number of chewing cycles, frequency of chewing cycles). CS: Control Saline; CT: Control L-Tryptophan; CPS: Cerebral Palsy Saline; CPTRI: Cerebral Palsy L=Tryptophan, (B) duration in seconds of rhythmic chewing phase, and (C) number of chewing cycles and (D) frequency of chewing cycles of the Control Saline (n = 10), Control TRI (n = 10), CP Saline (n = 10), CP TRI (n = 10) in the twenty-first (P21) day postnatal life. (A)The

scores of PCA analysis of CP Saline differed from those of both CP TRI and Control Saline ( $P < 0.0001$ ). No difference was found between CP TRI and Control Saline rats, while Control TRI animals differed from Control Saline animals ( $P < 0.0001$ ). (B) Both CP groups had a reduced duration of rhythmic chewing phase compared to their Control groups ( $*P < 0.05$ ). CP TRI showed a tendency for lesser chewing cycles, compared to Control TRI rats ( $P = 0.07$ ). CP Saline rats exhibited a lower frequency of chewing cycles, compared to both Control Saline rats and CP TRI rats ( $*P < 0.05$ ), yet Control and CP rats treated with TRI did not differ.

**Figure 4 Effect of CP and TRI on Phenotype of Masseter:** (A) Relative weight, (B: CS = I, CT = II, CPS = III, CPT = IV) histological sections and (C) percentage of the fibers type I (dark), IIA (light) and IIB (gray) of the masseter muscle, of the Control Saline ( $n = 5$ ), Control TRI ( $n = 5$ ), CP Saline ( $n = 5$ ), CP TRI ( $n = 5$ ) at 29 days postnatal life. (A) The relative weight of masseter in CP rats with either treatment was smaller than that of control rats treated either with saline or TRI ( $*P < 0.001$ ). The relative weight of masseter was higher in both groups treated with TRI compared with their respective Saline groups, and this relative weight was higher in CP TRI than in CP Saline ( $*P < 0.001$ ). (C) Both CP groups showed an increase in the percentage of type IIA fibers associated to a decrease in type IIB fibers compared to their respective Control groups ( $*P < 0.05$ ). Treatment with TRI promoted the opposite effect when compared Control Saline with Control TRI ( $P = 0.06$ ), and CP saline with CP TRI ( $*P < 0.05$ ).

**Table 1:** Correlations between specific variables, based on the individual scores along PC1 (x-axis) of animals obtained by using PCA. Pairwise two-sided p-values: \*p < 0.05.

## ANEXO A- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (CCB-UFPE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
UFPE  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS -CCB  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
CEUA

**PARECER**

Este parecer trata do Processo CEUA 0038-2016 submetido online pelo Professor Raul Manhães de Castro à Comissão de Ética no Uso de Animais para avaliação do uso de *Rattus norvegicus* no projeto de pesquisa intitulado "IMPLICAÇÕES DO TRATAMENTO NEONATAL COM L-TRIPTOFANO NO COMPORTAMENTO ALIMENTAR, ATIVIDADE LOCOMOTORA E MASTIGAÇÃO EM RATOS COM PARALISIA CEREBRAL". Além do projeto foi anexado o **FORMULÁRIO UNIFICADO PARA SOLICITAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO PARA USO DE ANIMAIS EM ENSINO E/OU PESQUISA**. O projeto de pesquisa tem relevante importância, dada a clara necessidade de descoberta de novas terapias para diminuir o fator incapacitante da paralisia cerebral a fim de melhorar a qualidade de vida de seus portadores.

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, os objetivos, os aspectos legais e o bem-estar animal, consideramos a solicitação de pesquisa científica **APROVADA**.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	23/10/2016 - 01/12/2017
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> – Linhagem Wistar
Nº de animais	30
Peso/Idade	90-120d / 220-250g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério de criação do Departamento de Nutrição da UFPE

Recife, 19 de setembro de 2016.