



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

GLAYCIELE LEANDRO DE ALBUQUERQUE

**PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL E MANIPULAÇÃO
SEROTONINÉRGICA: repercussões no sistema neuromotor de ratos no
período neonatal**

Recife

2020

GLAYCIELE LEANDRO DE ALBUQUERQUE

**PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL E MANIPULAÇÃO
SEROTONINÉRGICA: repercussões no sistema neuromotor de ratos no
período neonatal**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Área de concentração: Fisioterapia na Atenção à Saúde

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Elisa Toscano

Coorientador: Dr. Diego Cabral Lacerda

Recife

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

A345p Albuquerque, Gláyciele Leandro de.
Paralisia cerebral experimental e manipulação serotoninérgica: repercussões no sistema neuromotor de ratos no período neonatal / Gláyciele Leandro de Albuquerque. – 2020.
105 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Ana Elisa Toscano.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Paralisia cerebral. 2. Neurogênese. 3. Fluoxetina. I. Toscano, Ana Elisa (Orientadora). II. Título.

615.8 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-214)

GLAYCIELE LEANDRO DE ALBUQUERQUE

**PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL E MANIPULAÇÃO
SEROTONINÉRGICA: repercussões no sistema neuromotor de ratos no
período neonatal**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Aprovada em: 04/08/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Das Graças Rodrigues De Araújo (Examinadora Interna)

Prof^a. Dr^a. Carolina Peixoto Magalhães (Examinadora Externa)

Prof^o. Dr. Raul Manhães-De-Castro (Examinador Externo)

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida. Vocês significam tudo para mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por Ele sempre me dar forças, me proteger e me abençoar de todas as formas possíveis. Por Ele ser o elo entre eu e minha família, a quem entrego toda a distância e saudade, sabendo que Ele cuida de todos nós!

Aos meus pais, Anilza Iris Leandro de Albuquerque e Elizio Leitão de Albuquerque, que são meus maiores incentivadores, por serem meu porto seguro e estarem sempre ao meu lado, vibrando a cada conquista. Serei eternamente grata! Sem eles, nada seria possível nem tão pouco valeria a pena.

À memória de minha avó, Maria Inês Leandro, que tanto me abençoou e se preocupou comigo e que torcia por essa conquista. Saudades para sempre!

Aos meus irmãos e cunhados, Glaydiane e seu esposo Wesley e Glaydson e sua esposa Vanessa, por todo companheirismo, apoio e entretenimento nessa caminhada.

Aos meus sobrinhos, Elis, Nicole e Théo, por toda bagunça, brincadeiras e abraços apertados nos finais de semana corridos.

A minha gata, Nala, pelo companheirismo nas madrugadas e por não me deixar perder a hora.

Ao meu namorado, Thiago Duarte, que dividiu comigo todas as minhas angústias e preocupações. Pelo incentivo, cuidado e todo amor e carinho partilhados.

As minhas amigas e amigos de longas ou pequenas datas, são todos especiais demais para mim. Obrigada por poder dividir as mais variadas conversas, compartilhar momentos únicos e por tornarem a minha vida muito mais leve. Em especial, Fernanda, Karol e Bárbara, amo vocês!

Ao estudante de iniciação científica, Caio Matheus e a estagiária Graciele Sousa, por toda dedicação e suporte na realização desse trabalho.

Aos meus colegas do laboratório, Diego Visco, Bárbara, Henrique, Márcia e Sabrina, que me ajudaram em diversos momentos sempre que precisei.

A seu França e toda a equipe do Departamento de Nutrição, pelo suporte, compreensão e ajuda no biotério.

Ao meu co-orientador, Diego Cabral Lacerda, que demonstrou todo apoio possível e que conseguia com seu jeito me tranquilizar e fazer acreditar que ia dar certo.

À minha orientadora, Ana Elisa Toscano, que me orienta desde a graduação e a quem sou extremamente grata. Agradeço por acreditar em mim, por todos os conselhos e preocupação. A sua determinação e competência são referências para mim!

Aos docentes do programa de pós-graduação em Fisioterapia e a todos do Departamento de Fisioterapia, e também aos amigos que o mestrado me deu, Alice, Luiza, Laura e Kennedy, por todas as risadas e desabafos entendíveis, vocês tornaram essa jornada muito mais fácil.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A paralisia cerebral (PC) está comumente associada a déficits neuromotores. O uso de inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS) tem demonstrado efeitos benéficos sobre distúrbios hipóxico-isquêmicos através da neuroplasticidade. Esse estudo avaliou os efeitos da fluoxetina sobre o desenvolvimento neuromotor de ratos submetidos a um modelo experimental de PC no período neonatal. Trata-se de um estudo experimental, aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPE (0015/2018). Foram utilizados 107 ratos machos distribuídos nos grupos: Controle Salina (CS, n= 19), Controle Fluoxetina 10mg/kg (CF10, n= 16), Controle Fluoxetina 5mg/kg (CF5, n= 19), Paralisia Cerebral Salina (PCS, n= 19), Paralisia Cerebral Fluoxetina 10mg/kg (PCF10, n= 16) e Paralisia Cerebral Fluoxetina 5mg/kg (PCF5, n= 18). Os animais sofreram anóxia pós-natal associada a restrição sensório-motora. A fluoxetina (5 ou 10mg/kg) foi administrada no período de lactação. As avaliações neuromotoras incluíram: crescimento somático, maturação das características físicas, ontogênese de reflexos, atividade locomotora, força muscular, coordenação motora e análise do córtex somatossensorial. Os resultados estão expressos em média e erro padrão da média, sendo significativo para $p < 0,05$. A indução da PC restringiu o ganho de peso corporal, comprimento de cauda, eixo látero-lateral do crânio e eixo longitudinal nos grupos PCF5 e PCS. Nos testes de reflexos, apenas o de queda livre e o de geotaxia negativa demonstraram alterações nos grupos PCF5 e PCS. Não houve diferenças significativas importantes sobre as características físicas nem sobre a força muscular de nenhum grupo avaliado. A análise da coordenação e de atividade locomotora demonstraram pior desempenho dos animais dos grupos PCF5 e PCS comparado aos seus respectivos controles. A avaliação do córtex somatossensorial foi marcada por aumento do número de neurônios no grupo CF5 em comparação aos demais controles. As células da glia demonstraram maior número nos grupos PCF10 e CF10 em comparação aos demais grupos. Assim, apesar das alterações encontradas após o uso da fluoxetina nas avaliações somáticas, reflexas, de locomoção e equilíbrio nos grupos submetidos a paralisia cerebral, verificou-se que a administração de alta dosagem de fluoxetina acarreta em neuroinflamação e neurotoxicidade devido ao aumento de células da glia, que promove ativação imune precoce e astrogliose reativa, impedindo o surgimento e regeneração dos axônios. Enquanto isso, a utilização da

baixa dosagem desse ISRS demonstrou um efeito positivo e estimulante da neurogênese, abrindo caminhos para novas perspectivas de tratamento na PC.

Palavras-chave: Paralisia Cerebral. Neurogênese. Fluoxetina.

ABSTRACT

Cerebral palsy (CP) is commonly associated with neuromotor deficits. The use of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) has demonstrated beneficial effects on hypoxic-ischemic disorders through neuroplasticity. This study evaluated the effects of fluoxetine on the neuromotor development of rats used in an experimental model of CP in the neonatal period. This is an experimental study, approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at UFPE (0015/2018). 107 male rats were distributed in groups: Saline Control (CS, n = 19), Fluoxetine Control 10 mg / kg (CF10, n = 16), Fluoxetine Control 5 mg / kg (CF5, n = 19), Saline Cerebral Palsy (CPS, n = 19), cerebral palsy fluoxetine 10mg / kg (CPF10, n = 16) and cerebral palsy fluoxetine 5mg / kg (CPF5, n = 18). The animals suffered postnatal anoxia associated with sensory-motor restriction. Fluoxetine (5 or 10mg / kg) was administered during the lactation period. Neuromotor evaluations include: somatic growth, maturation of technical characteristics, reflex ontogenesis, locomotor activity, muscle strength, motor coordination and analysis of the somatosensory cortex. The results are expressed as mean and standard error of the mean, being significant for $p < 0.05$. An induction of restricted CP or gain in body weight, tail length, lateral-lateral axis of the skull and longitudinal axis in the CPF5 and CPS groups. In the reflex tests, only free fall and negative geotaxy showed changes in the CPF5 and CPS groups. There were no important differences regarding the resources involved in the muscular strength of any group evaluated. An analysis of coordination and locomotive activity showed the worst performance of animals in groups CPF5 and CPS compared to their controls. An assessment of the somatosensory cortex was marked by an increase in the number of neurons in the CF5 group compared to the other controls. And as glial cells showed a greater number in the CPF10 and CF10 groups compared to other groups. Thus, despite the changes found after the use of fluoxetine in somatic, reflex, locomotion and balance assessments in groups that have cerebral palsy, it was found that the administration of high dosage of fluoxetine results in neuroinflammation and neurotoxicity due to the increase in glia, which stimulates early immune activation and reactive astrogliosis, preventing the emergence and regeneration of axons. Meanwhile, the use of the low dosage of this SSRI, a positive and stimulating effect of neurogenesis, opens the way for new perspectives of treatment in CP.

Keywords: Cerebral Palsy. Neurogenesis. Fluoxetine.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática dos grupos experimentais. (p.34)
- Figura 2 - Cronograma de testes e tratamento desde o dia do nascimento até a morte do animal. (p.34)
- Figura 3 - Evolução do peso corporal de acordo com os grupos experimentais: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19) e PCF5 (n= 18) nos dias 8, 14, 17, 21 e 28 dias de vida pós-natal. (p.43)
- Figura 4 - Avaliação do comprimento de cauda dos grupos experimentais nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). (p.44)
- Figura 5 - Avaliação do eixo latero-lateral do crânio nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). (p.44)
- Figura 6 - Avaliação do eixo anteroposterior do crânio nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). (p.45)
- Figura 7 - Avaliação do eixo longitudinal nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). (p.46)
- Figura 8 - Distância percorrida (m) pelos grupos experimentais no 8º, 14º, 17º, 21º e 28º dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). (p.49)
- Figura 9 - Velocidade média (m/s) dos grupos experimentais no 8º, 14º, 17º, 21º e 28º dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). (p.49)
- Figura 10 - Potência média (mW) dos grupos experimentais no 8º, 14º, 17º, 21º e 28º dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). (p.50)
- Figura 11 - Energia cinética (J) dos grupos experimentais no 8º, 14º, 17º, 21º e 28º dia de vida pós-natal. CS (n=19), CF5 (n=19), PCS (n=19), PCF5

(n=18). (p.50)

Figura 12 - Tempo parado (s) dos grupos experimentais no 8^o, 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). (p.51)

Figura 13 – Número de paradas dos grupos experimentais no 8^o, 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). (p.52)

Figura 14 - Relação do tempo parado (s) / número total de paradas (n) dos grupos experimentais no 8^o, 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). (p.52)

Figura 15 - A) Tempo na área 1; B) Tempo na área 2 e C) Tempo na área 3 no 8^o, 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). (p.53)

Figura 16 - Avaliação da coordenação motora através do Rota-rod (s) de acordo com os grupos experimentais no 29^o dia de vida pós-natal: CS (n= 15), CF5 (n= 15), PCS (n = 15) e PCF5 (n =15). (p.54)

APÊNDICE A

Figure 1 - PCA analysis on the animals' body weight on days 1, 8, 14, 17 and 21 days of postnatal life. (p.67)

Figure 2 - Effect of CP and Fluoxetine on the animals' body weight (g) after birth of CS (n=19), CF10 (n=16); CF5 (n=19), CP (n=19), CPF10 (n=16) and CPF5 (n=18) rats on 1, 8, 14, 17 and 21 days of postnatal life. (p.68)

Figure 3 - Microscopic images representative of the S1 area stained with HE showing neurons (blue) by the larger shape with non-spherical outline and glial cells (yellow) identified by their spherical size and smaller in the groups CS = 11 (A), CF10 = 5 (B), CF5 = 8 (C), CPS = 13 (D), CPF10 = 4 (E), CPF5 = 8 (F). (p.68)

Figure 4 - PCA analysis on the number of neurons, number of glial cells, glia/neuron index on the 29th day of postnatal life. (p. 69)

Figure 5 - Number of neurons per unit area in the experimental groups CS (n=11), CF10 (n=5), CF5 (n=8), CPS (n=13), CPF10 (n=4), CPF5 (n=8). (p.70)

Figure 6 - Number of glial cells per unit area in the experimental groups CS (n=11), CF10 (n=5), CF5 (n=8), CPS (n=13), CPF10 (n=4), CPF5 (n=8). (p.71)

Figure 7 - The glial/neuron index of experimental groups CS (n=11), CF10 (n=5), CF5 (n=8), CPS (n=13), CPF10 (n=4), CPF5 (n=8). (p.72)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Maturação das características físicas nos grupos experimentais entre os dias 1 e 21 de vida pós-natal. (p.46)

Tabela 2 - Análise da ontogênese de reflexos nos grupos experimentais entre os dias 1 e 21 de vida pós-natal. (p.47)

Tabela 3 - Testes de força muscular (GRIP e suspensão) no 28º dia de vida. (p.54)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA	Abertura do conduto auditivo
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
AO	Abertura ocular
APA	Abertura do pavilhão auditivo
AVC	Acidente vascular cerebral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CC	Comprimento de cauda
CREB	Proteína ligante do elemento responsivo ao ampc
EAPC	Eixo antero-posterior do crânio
EII	Erupção incisivos inferiores
EIS	Erupção incisivos superiores
EL	Eixo longitudinal
ELLC	Eixo latero lateral do crânio
EVA	Etil vinil acetato
HE	Hematoxilina eosina
ISRS	Inibidores seletivos de recaptção de serotonina
LPS	Lipossacarídeos
NACL	Cloreto de sódio
PC	Paralisia cerebral
PCA	Análise de componentes principais
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
S1	Córtex somatossensorial
TGI	Trato gastrointestinal
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
5HT	Serotonina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1	DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR NA PARALISIA CEREBRAL.....	21
2.2	ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS FARMACOLÓGICAS NO DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR.....	23
2.3	EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS SEROTONINÉRGICAS NAS DOENÇAS NEUROLÓGICAS.....	25
3	JUSTIFICATIVA.....	30
4	HIPÓTESE.....	31
5	OBJETIVOS.....	32
5.1	OBJETIVO GERAL.....	32
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
6	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
6.1	DESENHO DO ESTUDO.....	33
6.2	LOCAL DO ESTUDO.....	33
6.3	PERÍODO DO ESTUDO.....	33
6.4	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	33
6.5	AMOSTRA.....	33
6.6	CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	33
6.7	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	33
6.8	TRATAMENTO.....	34
6.9	MODELO DE PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL.....	35
6.10	ANÁLISES EXPERIMENTAIS.....	35

6.10.1	Avaliação do peso corporal.....	35
6.10.2	Avaliações murinométricas.....	35
6.10.3	Estudo da maturação das características físicas.....	36
6.10.4	Análise da ontogênese dos reflexos.....	37
6.10.5	Avaliação do padrão da atividade locomotora.....	38
6.10.6	Estudo da coordenação motora.....	39
6.10.7	Estudo da força muscular.....	39
6.10.8	Perfusão transcardíaca e retirada do encéfalo.....	40
6.10.9	Análise histomorfométrica do córtex somatossensorial.....	40
6.11	DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS.....	40
6.11.1	Variáveis independentes.....	40
6.11.2	Variáveis dependentes.....	41
6.12	ASPECTOS ÉTICOS.....	41
6.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
7	RESULTADOS.....	43
8	DISCUSSÃO.....	55
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
	REFERÊNCIAS.....	92
	APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL PROVENIENTE DOS DEMAIS RESULTADOS OBTIDOS DA DISSERTAÇÃO.....	60
	APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF CHEMICAL NEUROANATOMY.....	101
	ANEXO A – FICHAS DE AVALIAÇÃO.....	102
	ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	105

1 INTRODUÇÃO

A Paralisia Cerebral (PC) é uma síndrome infantil complexa decorrente de uma lesão ocorrida durante desenvolvimento cerebral fetal ou infantil e que se caracteriza por um conjunto de distúrbios de caráter permanente e não progressivo que afeta o desenvolvimento motor de crianças acometidas (COLVER; FAIRHURST; PHAROAH, 2014; ROSENBAUM et al., 2007). Os eventos envolvidos na ocorrência da PC incluem fatores pré-natais (fatores genéticos, epigenéticos e ambientais), perinatais, cujo principal é a hipóxia-isquemia e pós-natais, como a nutrição (MARRET; VANHULLE; LAQUERRIERE, 2013).

A prevalência da PC é variável entre as diversas regiões do mundo (KENT, 2013). Em uma revisão sistemática envolvendo 49 artigos de diversos países europeus e norte-americanos, foi realizada uma estimativa da prevalência obtendo-se uma média de 2.11 casos a cada 1000 nascidos vivos (OSKOUI et al., 2013). Em países desenvolvidos, há uma variação de 2,0 a 3,5 casos por 1000 nascidos vivos (HERRERA-ANAYA et al., 2016). Já nos países em desenvolvimento, há uma escassez de dados que limita a definição dessa taxa epidemiológica (CANS; DE-LA-CRUZ; MERMET, 2008). No Brasil, estima-se que ocorra entre 30.000 a 40.000 novos casos por ano de Paralisia Cerebral (MANCINI et al., 2002).

A Paralisia Cerebral é considerada a mais comum deficiência motora da infância (PAKULA; VAN NAARDEN BRAUN; YEARGIN-ALLSOPP, 2009). Apresenta como sinais característicos espasticidade, discinesia, hiperreflexia, retardo no desenvolvimento de reações, fraqueza muscular, má coordenação motora de membros e problemas de equilíbrio e marcha (RICHARDS; MALOUIN, 2013). Além desses comprometimentos motores são observados distúrbios de sensação, percepção, cognição, comunicação e comportamento (ROSENBAUM et al., 2007), levando a limitações nas atividades de vida diária desses indivíduos.

Tradicionalmente, a paralisia cerebral pode ser classificada de acordo com a topografia (diplegia, hemiplegia e quadriplegia) e desordem do movimento (espástica, hipotônica, hipercinética, atáxica ou mista) (COLVER; FAIRHURST; PHAROAH, 2014; JOHARI et al., 2016). Assim, na tentativa de reproduzir os efeitos dessa patologia, alguns modelos experimentais foram desenvolvidos, sendo o de restrição sensório-motora associada a anóxia (COQ et al., 2008; MARCUZZO et al.,

2008; STRATA et al., 2004) o que mais se aproxima do fenótipo motor dessa síndrome.

O desenvolvimento do sistema nervoso no ser humano inicia-se na gestação, ocorrendo em regiões e períodos distintos, sendo observado principalmente até a 24ª semana de gestação a neurogênese, um fenômeno em que ocorre a proliferação, migração e organização das células precursoras neuronais e posteriormente, neurônios (MARRET; VANHULLE; LAQUERRIERE, 2013). Após a 24ª semana, inicia-se os eventos de crescimento, diferenciação, estabilização e especialização dos neurônios (MARRET; VANHULLE; LAQUERRIERE, 2013). Assim, até os primeiros 2 anos de vida, o cérebro passa por alguns períodos críticos de desenvolvimento cerebral que variam em diversas áreas cerebrais (KOLB; HARKER; GIBB, 2017). No rato, esse período crítico corresponde a fase de gestação e lactação (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

A plasticidade representa uma característica intrinsecamente dinâmica do sistema nervoso central (SNC) em se adaptar a determinados processos (ISMAIL; FATEMI; JOHNSTON, 2017; LESCH; WAIDER, 2012). Assim, o SNC em maturação, pode mudar estrutural e funcionalmente em resposta a experiências e a lesões (ISMAIL; FATEMI; JOHNSTON, 2017). O desenvolvimento do encéfalo está sujeito a exposição de diversos fatores pré e pós-natais que podem vir a alterar o seu desenvolvimento, influenciando a forma como reage em experiências futuras (KOLB et al., 2013). Entre os fatores ambientais que podem influenciar o desenvolvimento do encéfalo, temos as manipulações farmacológicas, nutricionais, experiências sensoriais, motoras e de linguagem precoces, estresse e microbioma (KOLB; HARKER; GIBB, 2017).

A serotonina é um neurotransmissor que está bastante presente no cérebro de humanos e de animais, afetando funções fisiológicas relevantes, como, saciedade, aprendizado, percepção da dor, humor e ciclo do sono-vigília, através da neuroplasticidade (BATSIKADZE et al., 2013a). Alguns estudos realizados com humanos (CHOLLET et al., 2011; PARIENTE J, LOUBINOX I, CAREL C, ALBUCHER JF, LEGER A, MANELFE C, RASCOL O, 2001) demonstraram ainda que o aumento da quantidade de serotonina, através do uso de inibidores de recaptação de serotonina, desempenha um papel importante de melhora na função motora de indivíduos acometidos por Acidente Vascular Cerebral (AVC)

(BATSIKADZE et al., 2013a) através da ativação do córtex motor por modulação da plasticidade (CHOLLET et al., 2011).

O uso de 20mg/dia de Inibidor Seletivo de Recaptação de Serotonina (ISRS) durante 90 dias reduziu o déficit neurológico e as dificuldades para as atividades de vida diária em pacientes adultos com AVC isquêmico agudo (HE et al., 2016). Estudos mostraram que o ISRS aumentou a produção de fator neurotrófico derivado do cérebro o qual exerce papel importante na sobrevivência neuronal, remodelação e diferenciação, portanto, melhorou a patologia neuronal e promoveu neuroregeneração (DE FOUBERT et al., 2004; KARPOVA et al., 2011; LIU et al., 2014a). Além disso, vários estudos experimentais indicam que o ISRS poderia regenerar neurônios hipocâmpais para melhorar a recuperação da função neurológica, bem como estimular a expressão do fator de crescimento endotelial vascular para efetiva neuroproteção (KUBERA et al., 2009; LEE et al., 2004; LI et al., 2009).

O uso neonatal de baixas doses (5mg/kg) de fluoxetina, ISRS, apresenta benefícios na neuroplasticidade, reduzindo o déficit funcional em ratos com lesão cerebral hipóxico-isquêmica e sem efeitos adversos na cognição ou no comportamento a longo prazo (CHANG et al., 2006). No entanto, altas doses neonatais (>10mg/kg) de fluoxetina exacerba déficits funcionais em ratos adultos com lesão cerebral hipóxico-isquêmica (CHANG et al., 2006). Doses acima de 10mg/kg durante a gestação (CAGIANO et al., 2008a) ou lactação (DA SILVA et al., 2014) reduz o peso ao nascer e aumenta a reatividade emocional em ratos submetidos a administração de fluoxetina durante o período pré-natal (CAGIANO et al., 2008a).

Diante do exposto, acredita-se que um aumento da atividade serotoninérgica induzido pelo tratamento neonatal com baixas doses de fluoxetina, um ISRS, tenha um efeito benéfico e contrário às sequelas da PC, contribuindo assim para o desenvolvimento neuromotor dos indivíduos acometidos. Assim, esse estudo busca reproduzir os efeitos dessa hipótese em modelo experimental de PC na maturação somática, ontogênese reflexa, desenvolvimento da atividade locomotora, coordenação motora e força muscular.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR NA PARALISIA CEREBRAL

A Paralisia Cerebral (PC) é descrita como sendo um conjunto de distúrbios de caráter permanente que afetam o desenvolvimento, o movimento e a postura, acarretando limitação das atividades (ROSENBAUM et al., 2007). Trata-se da incapacidade crônica mais comum na infância (JOHARI et al., 2016), caracterizando-se como uma lesão ocorrida durante o desenvolvimento cerebral fetal ou infantil (COLVER; FAIRHURST; PHAROAH, 2014; ROSENBAUM et al., 2007). É clinicamente apresentada como uma síndrome complexa do moto neurônio superior, não progressiva e com repercussões no sistema musculoesquelético (RICHARDS; MALOUIN, 2013).

A definição da PC tem variado nos últimos anos devido a sua heterogeneidade de sintomas (VAN LIESHOUT et al., 2017). Sinais clínicos como espasticidade, discinesia, hiperreflexia, atraso no desenvolvimento, déficit de força muscular, falta de coordenação e problemas no equilíbrio e na marcha (RICHARDS; MALOUIN, 2013) são alguns dos sintomas presentes nos portadores dessa patologia. Esses distúrbios motores são frequentemente acompanhados por alterações de sensação, percepção, cognição, comunicação e comportamento, além dos problemas músculo-esqueléticos secundários (ROSENBAUM et al., 2007).

Inicialmente, a Paralisia Cerebral foi classificada de acordo com os graus leve, moderado e severo ou como ambulantes e não-ambulantes (WIMALASUNDERA; STEVENSON, 2016). No entanto, devido à complexidade da síndrome, as classificações foram divididas de forma mais adequada, classificando quanto a topografia (monoplegia, diplegia, hemiplegia, tetraplegia e quadriplegia), quanto aos distúrbios do movimento (espástica, hipotônica, hipercinética, atáxica ou mista) e quanto a função (função motora grossa, função do membro superior e comunicação) (JOHARI et al., 2016; WIMALASUNDERA; STEVENSON, 2016).

Os registros de casos de PC revelam que há uma prevalência de 2 a 3,5 casos a cada 1000 nascidos vivos, esse número aumenta para 40 a 90 casos a cada mil nascidos vivos em crianças que nasceram pré-maturas (<28 semanas) ou com baixo peso (<1000g)(COLVER; FAIRHURST; PHAROAH, 2014; WIMALASUNDERA; STEVENSON, 2016). Os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da PC incluem: anormalidades placentárias, defeitos

congenitos, baixo peso ao nascer, aspiração de mecônio, cesariana de emergência, asfixia, convulsão neonatal, síndrome do desconforto respiratório, hipoglicemia e infecções neonatais (MCINTYRE et al., 2013).

Vários modelos animais, incluindo de roedores, primatas e porcos foram desenvolvidos para estudar os mecanismos de lesão cerebral na PC, suas repercussões e prováveis abordagens terapêuticas (GRAHAM et al., 2016). Através dos possíveis mecanismos fisiopatológicos de desenvolvimento da PC, foram desenvolvidos os modelos de hipóxia e isquemia, infecções e inflamações intrauterinas, ativação da cascata excitotóxica através dos receptores N-metil-D-aspartato e glutamato e utilização de ibotenato e quinolinato (FAN et al., 2015). Esses modelos apesar de tentarem elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa síndrome estão associados a resultados variáveis (FAN et al., 2015).

Visando abordar características clínicas como a acentuada deficiência motora encontrada na PC, o modelo animal que mais se aproxima do fenótipo motor dessa patologia é o de restrição sensorio motora, que utiliza da imobilização para promover, associada ou não a anóxia perinatal, a espasticidade (MARCUIZZO et al., 2010a; STRATA et al., 2004). Além disso, a restrição sensorio-motora associada a anóxia perinatal também levou a diminuição do peso corporal, alteração na atividade locomotora e desorganização do córtex motor primário nos animais submetidos a esse modelo (COQ et al., 2008).

O desenvolvimento cerebral em humanos e animais ocorrem de formas distintas. Nos roedores, por exemplo, esse período corresponde do 18º dia de vida embrionário até o 7º dia de vida pós-natal, enquanto que nos humanos ele ocorre principalmente no útero (GRAHAM et al., 2016). Assim, o período de desenvolvimento cerebral pós-natal que ocorre no rato é considerado equivalente ao recém-nascido atermo (BOKSA, 2010). Há ainda vantagens semelhantes a ambas espécies que devem ser consideradas, como a imitação da plasticidade humana e o estudo do controle motor adaptativo (GRAHAM et al., 2016).

O comportamento motor da criança inicia-se ainda na gestação, quando o feto começa a realizar alguns movimentos por volta da 7ª semana de gestação, demonstrando movimentos mais amplos e de maior complexidade após o nascimento (GRAMSBERGEN, 2001). No rato, pode aparecer por volta do 15º dia de vida, apresentando movimentos descoordenados e assimétricos após o

nascimento, demonstrando pouco controle motor, característica semelhante a ambas espécies no início da vida (GRAMSBERGEN, 2001). O desenvolvimento motor normal humano está associado a variação e a variabilidade adaptativa (HADDERS-ALGRA, 2010), assim o desenvolvimento é dependente da resposta desencadeada por experiências, a essa capacidade de adaptação, dá-se o nome de plasticidade (KOLB et al., 2013) .

A plasticidade representa uma característica do sistema nervoso central (SNC) em se adaptar a determinados processos (ISMAIL; FATEMI; JOHNSTON, 2017; LESCH; WAIDER, 2012). O SNC em maturação está mais vulnerável a sofrer mudanças tanto estruturalmente quanto funcionalmente após algum insulto significativo (GIZA; PRINS, 2006; ISMAIL; FATEMI; JOHNSTON, 2017). O desenvolvimento do encéfalo, que está sujeito a exposição de diversos fatores pré e pós-natais, pode influenciar a forma como o indivíduo reage em experiências futuras (KOLB et al., 2013).

Alguns fatores ambientais como as manipulações farmacológicas, nutricionais, experiências de linguagem precoces, sensoriais, motoras e estresse estão direto ou indiretamente envolvidos na plasticidade cerebral (KOLB; HARKER; GIBB, 2017). A lesão hipóxico-isquêmica no cérebro em desenvolvimento, dependendo da sua gravidade, causa dano seletivo ao córtex sensoriomotor, tálamo e gânglios da base interrompendo a modelagem das vias motoras centrais, o que mostra que em determinadas condições a plasticidade pode ser considerada desvantajosa apesar do cérebro imaturo ser mais maleável (ROCHA-FERREIRA; HRISTOVA, 2016).

Assim, a neuroplasticidade é vista como uma qualidade particular do cérebro por trazer efeitos benéficos através do crescimento de ramificações neurais levando a uma vasta arborização de dendritos e aumento da cognição (GIZA; PRINS, 2006). No entanto, as regiões do cérebro que ainda estão desenvolvendo suas projeções de fibras podem estar mais vulneráveis a uma conectividade neural anormal, decorrente de uma lesão ou de circuitos excitatórios excessivos, resultando em déficits funcionais clinicamente relevantes e incapacitantes para as estruturas envolvidas (GIZA; PRINS, 2006; GRAMSBERGEN, 2001).

2.2 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS FARMACOLÓGICAS NO DESENVOLVIMENTO MOTOR

O comprometimento do desenvolvimento motor está associado a alterações bioquímicas, morfológicas e fisiológicas do sistema musculoesquelético (KESAR et al., 2012). Essas alterações podem levar a um padrão de marcha alterado com diminuição da distância percorrida e da velocidade, além de redução do comprimento da passada (MARCUIZZO et al., 2008; SILVA et al., 2016). Além disso, também pode ocorrer redução no diâmetro e número de fibras, sendo percebida a atrofia muscular que está relacionada com o aumento do número de paradas na análise da atividade locomotora, decorrente de fadiga e aumento do gasto energético (KURZ; STUBERG; DEJONG, 2010; SILVA et al., 2016).

Sabe-se que o foco do tratamento da paralisia cerebral ultimamente não está em reverter lesões no cérebro ou em curar essa lesão, mas sim em minimizar danos e maximizar a capacidade da parte do cérebro que não está danificada para poder melhorar as funções motoras (DIAZ HEIJTZ; FORSSBERG, 2015). Assim, visando facilitar o desenvolvimento neuromotor, as intervenções terapêuticas devem ser iniciadas logo na primeira infância que é quando o sistema nervoso e o sistema musculoesquelético estão mais adaptáveis, de forma a aumentar os efeitos desejáveis, como modificação da espasticidade, controle de distúrbios e deformidades dos movimentos (EYRE, 2007; KOMAN; SMITH; SHILT, 2004).

Algumas estratégias de intervenção terapêutica, como as terapias com uso de fármacos, tem apresentado bons resultados em animais que sofreram episódios hipóxico-isquêmicos (ARTEAGA et al., 2015; DILEK et al., 2013). O uso de fármacos como entoxifilina, quando administrada durante o período gestacional e do resveratrol quando administrado diretamente em ratos filhotes influenciam diretamente no sistema nervoso central dos animais (ARTEAGA et al., 2015; DILEK et al., 2013).

A pentoxifilina é um derivado da metilxantina e inibidor de citocinas pró-inflamatórias, além de redutor da transcrição gênica e da produção de TNF em macrófagos e micróglia (DILEK et al., 2013). O uso da pentoxifilina durante o período gestacional, administrado via intraperitoneal nos 3 últimos dias de gestação da rata grávida com uma dose de 60mg/kg evidenciou que este fármaco tem um papel neuroprotetor no cérebro do rato neonatal, demonstrando também que houve uma diminuição da morte celular apoptótica e hipomielinização na substância branca periventricular (DILEK et al., 2013).

O resveratrol é um polifenol com potencial efeito antioxidante e neuroprotetor em modelos de regeneração (ARTEAGA et al., 2015). Quando aplicado em dose única de 20mg/kg intraperitonealmente, 10 minutos antes do episódio de hipóxia nos ratos filhotes, demonstrou efeito protetor ao cérebro desses animais que sofreram dano hipóxico-isquêmico e também efeito duradouro após verificado uma melhora dos resultados comportamentais quando os animais foram avaliados na vida adulta (ARTEAGA et al., 2015).

Além disso, a utilização de células tronco tem demonstrado ser uma terapêutica que tem apresentado resultados interessantes e que podem resolver alguns problemas através da reparação cerebral (KIASATDOLATABADI et al., 2017). Estudos apontam que o uso de células tronco melhora a lesão cerebral, função comportamental e reduz a hipomielinização sem causar efeitos colaterais prejudiciais em ratos hipóxico-isquêmicos, evidenciando o papel da utilização dessa terapêutica (CHEN et al., 2010; TSUJI et al., 2014).

Assim, apesar de apresentarem mecanismos de ação diferentes, estes fármacos citados exercem habilidade neuroprotetora no cérebro hipóxico-isquêmico com conseqüente melhora do resultado do neurodesenvolvimento de ratos, tanto a curto quanto a longo prazo, demonstrando estratégias válidas de serem avaliadas e aplicadas para a melhora do desenvolvimento neuromotor (ARTEAGA et al., 2015; DILEK et al., 2013; MAZUR; MILLER; ROBINSON, 2010) .

2.3 EFEITOS DE SUBSTÂNCIAS SEROTONINÉRGICAS NAS DOENÇAS NEUROLÓGICAS

As doenças neurológicas em geral têm um impacto negativo na vida dos portadores por afetar a qualidade de vida desses indivíduos uma vez que a grande maioria desenvolve sequelas motoras significantes (GELDENDUYS; VAN DER SCHYF, 2009). Sendo a serotonina um neurotransmissor bastante presente no cérebro humano e de animais e atuante em funções fisiológicas relevantes como, saciedade, aprendizado, percepção da dor, humor e ciclo do sono-vigília muito tem sido estudado sobre a atuação do sistema serotoninérgico nas doenças neurológicas (BATSIKADZE et al., 2013a).

A serotonina, conhecida também como 5-hidroxitriptamina (5-HT), foi descoberta inicialmente na década de 1950, sendo notada tanto no SNC como no

Sistema Nervoso Periférico (SNP) (DI GIOVANNI, 2013; MOHAMMAD-ZADEH, L. F., MOSES, L., GWALTNEY-BRANT, 2008). Foi identificada posteriormente no plasma, nas plaquetas e em outros órgãos como rim, pulmão, coração e no trato gastrointestinal (TGI) (MOHAMMAD-ZADEH, L. F., MOSES, L., GWALTNEY-BRANT, 2008). Atua ainda no processo de agregação plaquetária e coagulação do sangue, estimulação de muco e peristaltismo do TGI (BLIZIOTES, 2010; MOHAMMAD-ZADEH, L. F., MOSES, L., GWALTNEY-BRANT, 2008).

O sistema serotoninérgico é bastante amplo e organizado no cérebro dos mamíferos sendo a serotonina (5-HT) sintetizada por neurônios da rafe no cérebro (BLIZIOTES, 2010). Até o presente momento foram encontradas sete famílias de receptores 5-HT (5-HT1-5-HT7) ligados a membrana (DI GIOVANNI, 2013). A família 5-HT1 apresenta a principal idade sequencial desse neurotransmissor, possuindo 5 subtipos de receptores (5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E e 5-HT1F) (DI GIOVANNI, 2013). A família dos receptores 5-HT2 tem maior destaque quanto a terapêutica, uma vez que representa um possível alvo para tratamento de distúrbios do SNC (DI GIOVANNI, 2013).

A sinalização central de 5-HT é comumente estudada por exercer um papel fundamental no tratamento de algumas doenças do SNC (BLIZIOTES, 2010). As famílias dos receptores de 5-HT4, 5-HT6 e 5-HT7 promovem a formação de AMPc e estão sendo cada vez mais estudadas tendo em vista que esses receptores apresentaram maior afinidade com antipsicóticos (DI GIOVANNI, 2013). Além disso, o receptor 5-HT7 também está envolvido no processo de termorregulação, no ritmo circadiano, regulação do sono e aprendizagem e memória, o que traduz um resultado importante no tratamento de doenças neuropsiquiátricas (DI GIOVANNI, 2013).

A 5-HT está envolvida em eventos do desenvolvimento, incluindo divisão celular, migração neuronal, diferenciação de células e sinaptogênese durante períodos específicos do desenvolvimento cerebral fetal (AZMITIA, 2001a). Assim, possíveis insultos que desregulem a síntese da serotonina podem levar ao desenvolvimento cerebral anormal e déficits comportamentais (WILLIAMS et al., 2017a). Sabe-se que a serotonina é sintetizada a partir do precursor triptofano, e que este aminoácido tem seu papel regulatório bastante presente na placenta, assim, o metabolismo regulado de triptofano materno contribui para a produção de

5HT fetal em períodos cruciais de desenvolvimento no útero (WILLIAMS et al., 2017a).

A desregulação do metabolismo de triptofano na placenta e no cérebro fetal através de neuroinflamação causada por endotoxina (LPS – 20µg/kg) via intra-uterina em coelhas no G28 levou a diminuição nos níveis de triptofano (WILLIAMS et al., 2017a). Como consequência, houve diminuição da 5-HT no cérebro fetal relacionando a neuroinflamação causada, levando a alterações no desenvolvimento motor de coelhos (WILLIAMS et al., 2017a). Um outro estudo corrobora os mesmos resultados, demonstrando que a inflamação através da injeção intra-uterina de 20 mg / kg de endotoxina de *Escherichia coli* em coelhas grávidas no G28, desregula o metabolismo de triptofano (KANNAN et al., 2011a). Essa desregulação promove neurotoxicidade que acarreta em diminuição da 5-HT, podendo levar a alterações na regulação do desenvolvimento cerebral (KANNAN et al., 2011a).

Assim, busca-se por mecanismos que procurem reverter as alterações na regulação desse sistema, como é o caso do mecanismo serotoninérgico envolvido no tratamento de depressão, por exemplo, que através do uso de inibidores seletivos de recaptação de serotonina demonstrou aumento da neurogênese, aumento da arborização dendrítica e da sinaptogênese, refletindo um papel importante da neuroplasticidade desse sistema (BATSIKADZE et al., 2013a; CHANG et al., 2006).

A plasticidade no cérebro isquêmico está relacionada a vários fatores, os principais são envelhecimento e manipulações farmacológicas (KIM et al., 2017b; SUN et al., 2017). Logo, muito tem sido estudado quanto a utilização da farmacoterapia no tratamento de distúrbios neurológicos, sendo observada uma abordagem promissora a utilização de inibidores seletivos de recaptação de serotonina, como a fluoxetina, que demonstraram um papel neuroprotetor, anti-inflamatório e de neuroregeneração importante em indivíduos que sofreram isquemia cerebral (SUN et al., 2017).

A neurogênese no cérebro normal ocorre continuamente em algumas regiões específicas, como na zona subventricular e no giro denteado (KHODANOVICH et al., 2018). Em um estudo com ratos, foi verificado que a utilização crônica da fluoxetina levou ao aumento da neurogênese tanto na zona subventricular quanto no giro denteado (SUN et al., 2015). Já em um outro estudo, foi verificado que o uso crônico da fluoxetina aumentou a proliferação de células neuroprogenitoras em ratos com cérebro normal (ENCINAS; VAAHTOKARI; ENIKOLOPOV, 2006). A atividade

serotoninérgica parece ter um papel importante nos mecanismos que controlam o desenvolvimento tanto do ponto de vista filogenético como ontogenético (AZMITIA, 2001a)

A formação de novos vasos, fenômeno conhecido como angiogênese, tem apresentado destaque em meio a utilização de ISRS uma vez tal fenômeno desempenha um papel importante na remodelação do tecido isquêmico do cérebro (SUN et al., 2017). Mediada por diversos fatores de crescimento, a principal hipótese é de que o aumento considerável da angiogênese seja decorrente do aumento da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) ocasionado pela administração da fluoxetina (GONZENBACH et al., 2011; SUN et al., 2017).

Alguns estudos (CHOLLET et al., 2011; PARIENTE J, LOUBINOUX I, CAREL C, ALBUCHER JF, LEGER A, MANELFE C, RASCOL O, 2001) demonstraram que o aumento da quantidade de serotonina na fenda sináptica, através do uso de inibidores seletivos de recaptação de serotonina (ISRS), desempenhou um papel importante na melhora na função motora de indivíduos acometidos por AVC (BATSIKADZE et al., 2013a). Houve ainda ativação do córtex motor na modulação da plasticidade e melhora da capacidade neurocomportamental em modelos animais de acidente vascular cerebral isquêmico (CHOLLET et al., 2011; MCCANN et al., 2014).

Alguns estudos com animais que sofreram dano isquêmico cerebral durante a idade adulta (KHODANOVICH et al., 2018) ou no período fetal (ZHANG et al., 2012) e utilizaram ISRS em doses altas (>10mg/kg) demonstraram a diminuição na perda de neurônios e ocorrência de reforço da neuroplasticidade, ocorrendo neuroproteção mediada por inibição da micróglia e consequente diminuição de fatores pró-inflamatórios, melhoria da auto-regulação do fluxo sanguíneo cerebral, redução do estresse oxidativo e modulação do sistema neuro-hormonal adrenérgico. No entanto, há evidências que mostraram que a utilização de altas doses resultou em consequências neurocomportamentais, como aumento da reatividade emocional e alteração do sistema motivacional, além de baixo peso (CAGIANO et al., 2008a).

No entanto, há alguns estudos relatando que doses altas de fluoxetina exarcebam déficits funcionais em animais hipóxico-isquêmicos (CHANG et al., 2006). Enquanto que doses mais baixas (<5mg/kg) tendem a diminuir déficits funcionais em ratos adultos hipóxico-isquêmicos (CHANG et al., 2006). Tal mecanismo neuroprotetor tem sido associado ao aumento da produção de fator de

crescimento endotelial vascular, aumento da fosforilação da proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc (CREB) e aumento da neurogênese (CHANG et al., 2006). Foi visto ainda que a utilização de baixas doses no início da vida não produziu efeitos adversos a longo prazo na cognição ou no comportamento (CHANG et al., 2006).

3 JUSTIFICATIVA

A plasticidade fenotípica permite que o ambiente altere o desenvolvimento para melhor atender as demandas necessárias. Assim, a 5-HT está envolvida na modulação de eventos do desenvolvimento, incluindo a divisão celular, migração neuronal, diferenciação das células e sinaptogênese, através de uma grande variedade de receptores com ações limitadas e diferenciadas durante períodos específicos do desenvolvimento. A abordagem experimental através da manipulação farmacológica do sistema de neurotransmissão serotoninérgico tem contribuído sobremaneira para compreensão desses mecanismos que envolvem a participação da 5-HT. Dessa forma, tendo em vista a diminuição da serotonina causada por neurotoxicidade decorrente da desregulação ocorrida durante sua síntese no período fetal (KANNAN et al., 2011), a manipulação da disponibilidade de 5-HT na fenda sináptica com inibidores seletivos da recaptação da 5-HT (ISRS) deve ser estudada.

Foi observada a melhora da função motora em pacientes com AVC's que fizeram uso de ISRS (CHOLLET et al., 2011; PARIENTE J, LOUBINOUX I, CAREL C, ALBUCHER JF, LEGER A, MANELFE C, RASCOL O, 2001) e também redução do stress oxidativo durante o desenvolvimento do cérebro após administração neonatal de ISRS (DA SILVA et al., 2014). No entanto, mais estudos são necessários sobre a dose que deve ser utilizada para fins benéficos, visto que altas doses podem comprometer o desenvolvimento neuromotor (CHANG et al., 2006). Enquanto que baixas doses reduzem o déficit funcional em animais que sofreram isquemia (CHANG et al., 2006). Diante disso, é preciso investigar os efeitos da utilização de fluoxetina em alta e baixa dosagem em modelo experimental de paralisia cerebral afim de elaborar estratégias eficazes de intervenção precoce em indivíduos acometidos por essa patologia.

4 HIPÓTESE

A administração de fluoxetina em baixa dosagem (5mg) atenua danos sobre a função motora e parâmetros histomorfométricos do córtex somatossensorial em comparação a utilização de uma alta dosagem (10mg) em ratos neonatos submetidos a modelo experimental de PC.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos de uma dose alta (10mg) e de uma dose baixa (5mg) de fluoxetina sobre o desenvolvimento neuromotor de ratos submetidos ao modelo experimental de paralisia cerebral no período neonatal.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Registrar o peso corporal;
- Avaliar as características murinométricas;
- Verificar maturação de características físicas;
- Analisar a ontogênese dos reflexos;
- Avaliar a atividade locomotora;
- Mensurar a força muscular;
- Avaliar a coordenação e o equilíbrio;
- Analisar a histomorfometria do córtex somatossensorial.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 DESENHO DO ESTUDO: Trata-se de um estudo experimental controlado e randomizado.

6.2 LOCAL DO ESTUDO: Realizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - campus Recife e no Laboratório de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco - campus Vitória de Santo Antão.

6.3 PERÍODO DO ESTUDO: A coleta ocorreu entre julho de 2018 e julho de 2019.

6.4 POPULAÇÃO DO ESTUDO: Ratos machos da raça *Rattus norvegicus albinus* da linhagem *Wistar*.

6.5 AMOSTRA: Foram utilizados 107 ratos machos obtidos do acasalamento de fêmeas nulíparas (n=24) e machos reprodutores (n=8) na proporção de 2 fêmeas:1 macho. Os animais foram mantidos no Biotério de experimentação do Departamento de Nutrição da UFPE ciclo claro-escuro invertido de 12/12 horas sob a temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, alojados em gaiolas de polipropileno com dimensões 46x31x21cm (CxLxA) e livre acesso à água filtrada e alimentação (dieta labina).

6.6 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE: As fêmeas utilizadas para acasalar tinham idade entre 90 e 120 dias e peso entre 220-250g e eram primíparas. Os filhotes utilizados foram os machos com peso ao nascer entre 5 e 6 gramas. As fêmeas foram utilizadas apenas para completar a ninhada no caso de proles com menos de oito filhotes machos.

6.7 GRUPOS EXPERIMENTAIS: Após a confirmação da gestação, realizado por acompanhamento do peso corporal das ratas em acasalamento, as ratas foram mantidas em gaiolas individuais. Ao nascimento, cada ninhada foi composta por 8 filhotes machos, sendo utilizado as fêmeas apenas para completar a ninhada. Apenas os filhotes machos foram avaliados. Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos grupos: Controle Salina (CS, n=19), Controle Fluoxetina 10mg/kg

(CF10, n=16), Controle Fluoxetina 5mg/kg (CF5, n=19), Paralisia Cerebral Salina (PCS, n=19), Paralisia Cerebral Fluoxetina 10mg/kg (PCF10, n=16) e Paralisia Cerebral Fluoxetina 5mg/kg (PCF5, n=18) sendo mantidos com suas respectivas genitoras até os 21 dias de vida, quando foi realizado o desmame.

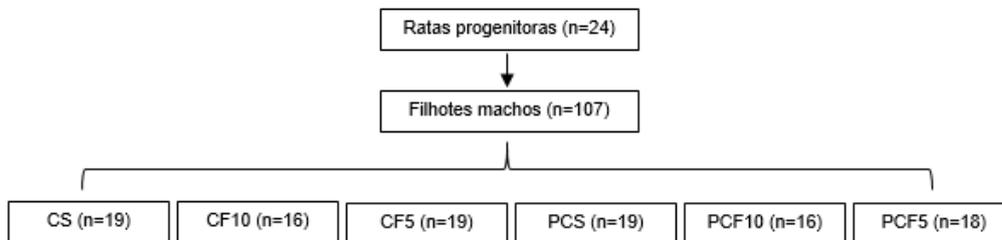


Figura 1. Representação esquemática dos grupos experimentais. CS= controle e salina; CF10= controle e fluoxetina 10 mg/kg; CF5= controle e fluoxetina 5 mg/kg PCS= paralisia cerebral e salina; PCF10 = paralisia cerebral e fluoxetina 10mg/kg; PCF5 = paralisia cerebral e fluoxetina 5mg/kg.

6.8 TRATAMENTO: Foi realizado do 1º ao 21º dia de vida a aplicação de fluoxetina, um ISRS, durante o período de lactação. A concentração da droga administrada de 5 mg/kg ou 10mg/kg variou de acordo com o grupo ao qual o animal pertencia. A droga foi obtida na forma de cloridrato de fluoxetina (Bristol-USA®) e dissolvida em veículo controle, uma solução salina (NaCl) a 0.9%. No grupo controle foi utilizado solução de Cloreto de Sódio (NaCl) a 0,9% por peso corporal. A administração foi realizada via subcutânea no dorso do animal, diariamente, as 9:00h, horário em que há maior liberação de serotonina no hipotálamo (MATEOS et al., 2009).

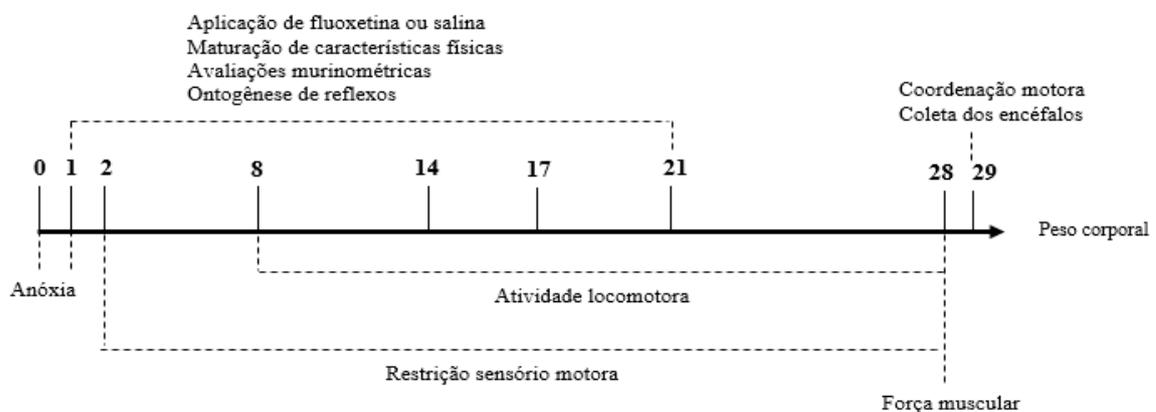


Figura 2. Cronograma de testes e tratamento desde o dia do nascimento até a morte do animal.

6.9 MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL: O modelo experimental de paralisia cerebral (COQ et al., 2008; MARCUZZO et al., 2008; STRATA et al., 2004) associa a anóxia perinatal à restrição sensório-motora dos membros inferiores, reproduzindo um fenótipo semelhante a diplegia espástica ocorrida na PC. Os animais dos grupos PCS e PCF foram submetidos a esse modelo que compreende dois episódios de anóxia: no dia do nascimento (P0) e no primeiro dia de vida (P1). Para isso, os animais 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. Após o término do processo, os filhotes foram colocados em temperatura e ar ambiente até recuperação da coloração rosada e devolvidos as suas mães.

Do P2 ao P28 foi realizada a restrição sensório-motora durante 16 horas por dia (17:00h às 9:00h do dia seguinte). Nas 8 horas restantes (09:00h às 17:00h), a livre movimentação do animal era permitida. Para a imobilização sensório-motora utilizamos uma órtese moldada com massa epóxi que permitia movimentos limitados da articulação do quadril, deixando os membros posteriores estendidos com o auxílio de fita micropore e esparadrapo complementar a órtese. A eliminação de fezes e urina e os cuidados maternos não foram prejudicados (STRATA et al., 2004).

Para a retirada da órtese, visando minimizar possíveis danos, pôde ser utilizado tesoura pequena e cotonete embebido em óleo mineral inodoro para facilitar a retirada da fita micropore e do esparadrapo. O uso de antisséptico foi adotado em locais que apresentaram pequenas feridas a fim de facilitar a cicatrização e reduzir infecções.

6.10 ANÁLISES EXPERIMENTAIS:

6.10.1 Avaliação do peso corporal: O peso de cada filhote foi registrado diariamente após o nascimento até 28 dias através de uma balança de precisão (Marte, capacidade de 1 kg e sensibilidade de 0,01 g).

6.10.2 Avaliações murinométricas: realizada nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 dias de vida pós-natal, às 13:00h, com auxílio de um paquímetro universal

(JOMARCA®) e por um único avaliador. Foram determinadas em milímetros (mm) as seguintes medidas:

Comprimento da cauda (CC): O animal é contido com uma das mãos do pesquisador. A cauda é estirada horizontalmente na borda de uma mesa lisa e plana onde será registrada uma marca com o auxílio de um lápis em papel milimetrado a extremidade e a base da cauda, sendo registrada a distância dos dois pontos em milímetros.

Eixo latero-lateral do crânio (ELLC): Considera-se como referência uma linha imaginária perpendicular ao eixo longitudinal do crânio, dividindo os pavilhões auriculares ao meio, mede-se a distância em milímetros.

Eixo anteroposterior do crânio (EAPC): Considera-se como referência a extremidade do focinho até extremidades posteriores dos pavilhões auriculares. O animal é contido com uma das mãos, a cabeça posicionada entre os dedos indicador e polegar e mede-se a distância em milímetros.

Eixo longitudinal (EL): Posiciona-se o animal em decúbito ventral sobre o papel milimetrado em uma superfície plana e são marcadas as extremidades da ponta do focinho e a base da cauda do animal. Mede-se então a distância em milímetros entre os pontos obtidos.

6.10.3 Estudo da maturação das características físicas: Realizado diariamente às 13:00h em cada animal e por um único avaliador, sendo registrado o tempo em dias desde o nascimento até a maturação da característica física avaliada:

Abertura do pavilhão auditivo (APA): Os dois pavilhões, primitivamente dobrados ao nascimento sobre o orifício auricular, ficam livres e palpáveis pelo pesquisador.

Abertura do conduto auditivo (ACA): Os dois orifícios auriculares, primitivamente obliterados, abrem-se, tornando visível e condizente com o teste de reflexo de resposta ao susto.

Erupção dos incisivos inferiores (EII): Observada quando o rompimento da gengiva ocorrer com exposição incisal.

Erupção dos incisivos superiores (EIS): Observada quando o rompimento da gengiva ocorrer com exposição incisal.

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

6.10.4 Análise da ontogênese dos reflexos: Avaliado diariamente em cada animal do 1º ao 21º dia pós-natal, às 13:00h e por um único avaliador, o desenvolvimento dos seguintes reflexos (método modificado de FOX, 1965; SMART; DOBBING, 1971): preensão palmar, recuperação de decúbito, colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício, resposta ao susto, geotaxia negativa e queda livre. Para cada reflexo, foi registrado como positivo o primeiro dia após três resultados positivos.

Preensão palmar: É realizado um leve toque com auxílio de uma haste de metal de aproximadamente 1mm de diâmetro na palma da pata anterior de cada animal. A resposta é positiva quando há flexão rápida. Esse reflexo difere dos demais pois tende a desaparecer com o passar dos dias.

Recuperação de decúbito: O animal é colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana. A resposta é positiva quando o animal gira o corpo e assume o decúbito ventral sobre quatro patas em até 10 segundos.

Colocação pelas vibrissas: O animal é suspenso pela cauda de forma que suas vibrissas toquem a borda de uma mesa. A resposta é positiva quando o animal coloca as patas anteriores sobre a mesa tentando caminhar no tempo de até 10 segundos.

Aversão ao precipício: O animal é colocado com as patas anteriores sobre a borda de uma superfície plana e alta de maneira a detectar que há um precipício. A resposta é positiva quando o animal, no tempo máximo de 10 segundos, desloca-se 45° do precipício.

Resposta ao susto: O animal é submetido a um ruído agudo produzido pela percussão de um bastão metálico sobre um recipiente também metálico a uma distância de aproximadamente 10 cm. A resposta é positiva quando ocorre uma rápida retração com a imobilização involuntária do corpo do animal.

Geotaxia negativa: O animal é colocado de cabeça para baixo no centro de uma rampa com 45° de inclinação revestida com papel crepom. O reflexo é positivo quando o animal se vira completamente para cima ou pelo menos 130 graus em um tempo de até 10 segundos.

Queda livre: O rato é segurado pelas quatro patas com o dorso voltado para baixo a uma altura de 30 cm onde será solto sobre um leito de algodão (30 x

12 cm). A resposta é positiva quando o animal gira completamente o corpo e cai na superfície com o ventre voltado para baixo.

6.10.5 Avaliação do padrão da atividade locomotora: A avaliação dos filhotes machos ocorreu as 12:00h, no ciclo escuro do animal, no 8º, 14º, 17º, 21º e 28º dia de vida pós-natal, que são considerados marcos no desenvolvimento da locomoção (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993). Foi utilizado um sistema de monitoramento em campo aberto circular (Ø1m) delimitado por paredes de 30 cm de altura com superfícies internas de cor preta e base de EVA (etil vinil acetato) também na cor preta. No teto, há fixa uma câmera digital (VTR® 6638-CCTV System) com sensor infravermelho e LED de iluminação com distância de 2,65 metros do solo e posicionada de forma a pegar todo campo aberto. Os animais foram posicionados no centro do campo aberto e filmados por um período de 5 minutos cada um. Após o registro do animal foi extraído algumas grandezas físicas a partir de um software específico de análise para se obter informações acerca do comportamento do animal. Para as filmagens utiliza-se o software Ulead Video Studio®. Após filmagem, o vídeo foi analisado no software ANY-maze para obtenção dos seguintes parâmetros: Distância Percorrida (m), Velocidade Média (m/s), Potência Média (mW), Energia cinética (J), Número total de paradas (n), Tempo parado (s); Relação de tempo parado/Número de Paradas (s), tempo permanecido na área 1 (s), tempo permanecido na área 2 (s) e tempo permanecido na área 3 (s) (SILVA et al., 2016).

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

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

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

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

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

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

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

Tempo nas áreas 1, 2 e 3 (s): O campo foi subdividido em 3 áreas circulares, sendo a área 1 mais central, 2 é intermediária e 3 é a área mais periférica. Cada área com o mesmo valor de raio (raio total do campo – R=50cm, dividido em 3 partes = r).

- Fórmula A1 = $\pi \cdot r^2$, onde π = letra grega “pi” = 3,14; r= raio da circunferência = 16,67cm.
- Fórmula A2 = $\pi(R1^2-r^2)$, onde R1= raio do segundo círculo=2r.
- Fórmula A3 = $\pi(R^2-R1^2)$, onde R=raio do campo.

6.10.6 Estudo da coordenação motora: Avaliado aos 29 dias de vida pós-natal do animal no equipamento Rota-Rod que avalia a coordenação motora e também o equilíbrio. Neste teste, o animal é colocado sobre uma haste texturizada de 60 mm de diâmetro e 75 mm de comprimento em rotação, a uma velocidade de 25 rpm com 5 tentativas e intervalos de 2 minutos entre elas (MARQUES et al., 2014). O animal tem que permanecer no Rota-Rod no máximo 3 minutos, sendo registrada a latência de queda. Para habituação, coloca-se o animal por 2 minutos em rotação de 16rpm e em seguida inicia a avaliação.

6.10.7 Estudo da força muscular: No Teste de Suspensão (narrow suspended bar), o animal fica suspenso pelas patas anteriores em um cabo de aço (3 milímetros de diâmetro) distante 1 metro do chão por um tempo limite de 1 minuto e meio, sendo registrada a latência de queda. Uma bandeja com espuma foi colocada sob o aparato para amortecer as quedas. Já o teste de força da preensão dos membros anteriores foi realizado através do equipamento Animal Grip Strength System (SD instruments). O animal agarra a barra de apoio exercendo uma força de tração sobre ela. O captor de força permite quantificar o pico de força de cada animal (g). Ambos os testes foram realizados no 28º dia de vida pós-natal.

6.10.8 Perfusão transcardíaca e retirada do encéfalo: No P29, os animais foram anestesiados profundamente com quetamina e xilazina (50mg/kg,) para realização da perfusão transcardíaca. Após abertura da cavidade torácica foi introduzida uma cânula para perfusão no ventrículo esquerdo. Esta foi acoplada a uma bomba peristáltica que foi acionada em velocidade compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Inicialmente foi infundido 150 ml de solução salina tamponada em tampão fosfato. A perfusão com salina foi seguida com a infusão de 400 ml solução fixadora (4% de paraformaldeído). Ao final da passagem do fixador, os encéfalos foram retirados do crânio e pós-fixados na mesma solução fixadora overnight e em seguida acrescida de sacarose (20%) por 24-48 horas para serem armazenados em freezer -80° para posterior criosecção.

6.10.9 Análise Histomorfométrica do córtex somatossensorial: Os encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 20 µm de espessura utilizando-se criostato (Leica®). Cinco séries de cortes coronais foram coletados para cada animal, colocados em placa de acrílico (25 cavidades) albuminizadas. Os cortes obtidos foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) para observação das características histológicas para evidenciar os neurônios. Foram capturadas imagens e digitalizadas (em 40x para contagem de células na camada V) da área de representação do membro inferior na área S1, identificadas através de coordenadas esterotáxica (-2,28 mm de bregma). Os campos microscópicos foram obtidos através de microscópio óptico OLYMPUS modelo U-CMAD-2 (objetiva 20x) acoplado a um programa para captação de imagens. Para contagem das células foi utilizado o software o software IMAGEJ versão 1.8.0_172. Em cada corte foi contado 10 campos (cinco no hemisfério direito e cinco no esquerdo). Os neurônios foram identificados pelo seu tamanho, geralmente maior e de contorno não esférico. As células da glia foram identificadas pelo seu aspecto esférico. A relação glia-neurônio foi calculada como a proporção das células da glia por neurônios (adaptada de MARCUZZO et al., 2010).

6.11 DESCRIÇÃO DAS VARIÁVEIS

6.11.1 Variáveis independentes

- De interesse: Modelo experimental de Paralisia Cerebral e aplicação da Fluoxetina ou da solução salina;

- De controle: Idade e sexo dos filhotes.

6.11.2 Variáveis dependentes

- Peso corporal dos filhotes;
- Características murinométricas: comprimento da cauda, eixo látero-lateral do crânio, eixo ântero-posterior do crânio e eixo longitudinal;
- Maturação de características físicas: abertura do pavilhão auditivo, abertura do conduto auditivo, erupção dos incisivos inferiores e superiores e abertura dos olhos;
- Ontogênese de reflexos: preensão palmar, recuperação de decúbito, aversão ao precipício, colocação pelas vibrissas, geotaxia negativa, queda livre;
- Atividade locomotora: Distância Percorrida (m), Velocidade Média (m/s), Potência Média (mW), Energia cinética (J), Número total de paradas (n), Tempo parado (s); Relação de tempo total parado/Número de Paradas (s), tempo permanecido na área 1 (s), tempo permanecido na área 2 (s) e tempo permanecido na área 3 (s);
- Força muscular: teste GRIP e de suspensão;
- Coordenação motora: latência de queda no RotaRod;
- Histomorfometria do córtex somatossensorial: número de neurônios e células da glia por área.

6.12 ASPECTOS ÉTICOS

O manejo e os cuidados seguiram as recomendações da “DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA FINS CIENTÍFICOS E DIDÁTICOS - DBCA”. O estudo tem aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Biociências da UFPE (CEUA-CB/UFPE) com o registro 0015/2018.

6.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o software Graphpad Prism 6 para a obtenção dos dados dos testes de avaliação motora. Os dados obtidos foram analisados quanto à distribuição normal de probabilidade e quanto à homogeneidade das variâncias. Entre as variáveis quantitativas contínuas, foi realizado o teste de aderência Kolmogorov-Smirnov, sendo a distribuição normal, o teste paramétrico Anova Two Way para comparação de médias. Não sendo evidenciada distribuição normal,

utilizamos o teste não paramétrico Kruskal-Wallis. O teste post-hoc de Tukey foi realizado para todas essas variáveis. Os resultados estão expressos como média e erro padrão da média, sendo o nível de significância utilizado de 5% ($p < 0,05$). Além disso, também realizamos a análise dos dados e estatística através do R (Fundação R para Computação Estatística, Instituto de Estatística e Matemática, Viena, Áustria). Para avaliar possíveis relações entre conjuntos de variáveis dentro dos mesmos animais, usamos a análise de componentes principais (PCA) para reduzir a alta dimensionalidade. A PCA é definida como uma transformação linear ortogonal do conjunto de dados em um subespaço reduzido com novas coordenadas, para que a variação seja maximizada em cada novo eixo de coordenadas ou componente principal, minimizando assim a perda de informações. Um método de normalização, baseado no ajuste da média dos dados para 0 e no desvio padrão (DP) para 1, foi aplicado para permitir comparações de dados com valores e variações díspares. A PCA foi realizada em 2 conjuntos de variáveis, incluindo (1) peso corporal durante 5 períodos de medição do peso corporal (P1, P8, P14, P17 e P21), (2) análise S1 (número de neurônios, número de células da glia e glia / índice de neurônios). Assim, obtivemos uma pontuação para cada rato e para cada conjunto de variáveis ao longo do eixo PC1 ou eixo x que diferenciou otimamente os diferentes grupos de animais. O objetivo era correlacionar os escores de cada rato entre as 2 variáveis, ou seja, os escores que caracterizaram cada animal de maneira ideal para um determinado conjunto de variáveis. Usamos esses escores ótimos para realizar ANOVA subsequente entre todos os 6 grupos usando R.

7 RESULTADOS

PESO CORPORAL

O peso corporal aumentou gradativamente do P8 ao P28 em todos os grupos. Não houve diferença significativa entre controle salina e fluoxetina ($p>0,05$). Ao compararmos os grupos PC com seus respectivos controles, observamos uma limitação no ganho de peso corporal a partir do 8º dia entre PCF5 e CF5 ($p<0,05$) e também a partir do 14º dia de vida pós-natal entre PCS e CS ($p<0,01$). Esse dado aponta para o efeito da paralisia cerebral sobre o peso corporal do animal. No entanto, não foi observada diferença entre PCF5 e PCS, sugerindo pouca influência da fluoxetina no peso corporal dos animais (Figura 3).

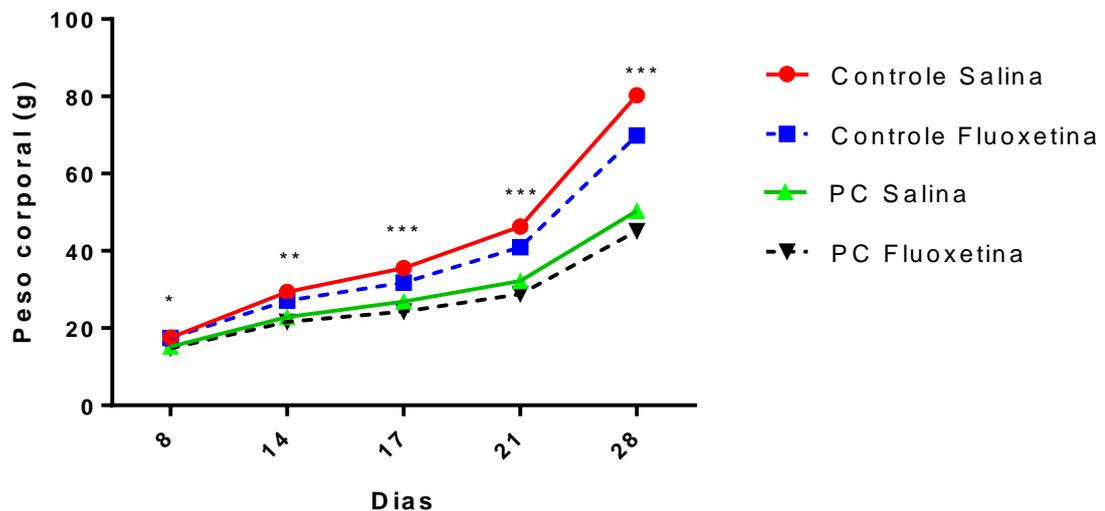


Figura 3. Evolução do peso corporal de acordo com os grupos experimentais: CS ($n= 19$), CF5 ($n= 19$), PCS ($n= 19$) e PCF5 ($n= 18$) nos dias 8, 14, 17, 21 e 28 dias de vida pós-natal. O peso corporal de ambos os grupos PC foi menor comparado com aos grupos Controle ($*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,0001$).

AVALIAÇÕES MURINOMÉTRICAS

A avaliação do comprimento de cauda nos grupos controles não apresentou diferença significativa em nenhum dos dias avaliados ($p>0,05$). O grupo PCF5 apresentou menor comprimento de cauda quando comparado a CF5, nos dias 6 e 9 ($p<0,001$) e também nos dias 12, 15, 18 e 21 ($p<0,0001$). A comparação entre PCS e CS demonstrou menor comprimento de cauda no grupo paralisia a partir do dia 6 até o dia 21 da avaliação ($p<0,001$). Contudo, não foi observado diferenças na

comparação entre grupos PC, sugerindo que a diferença no comprimento da cauda possa estar relacionada a indução da PC, sem envolvimento da fluoxetina em baixa dosagem (Figura 4).

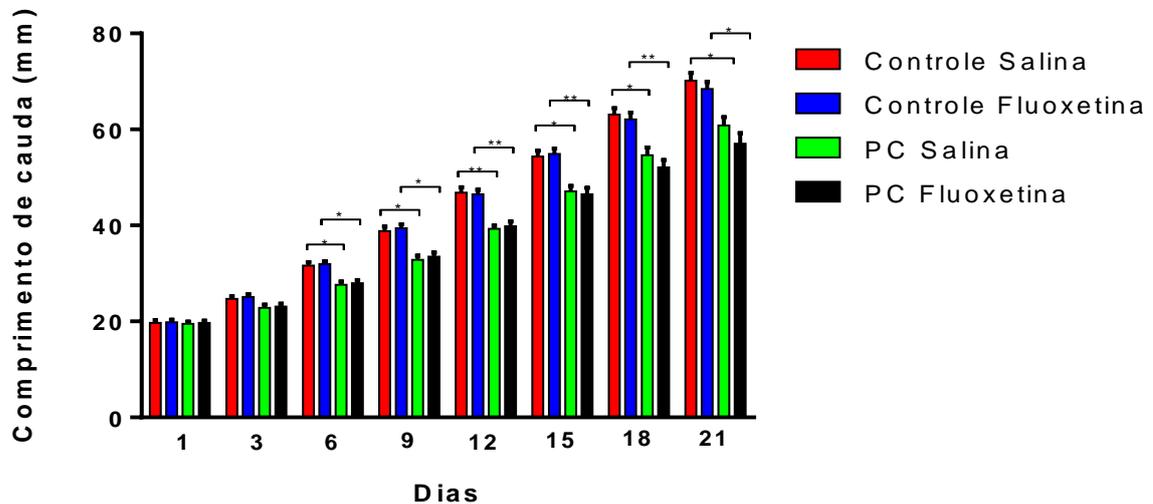


Figura 4. Avaliação do comprimento de cauda dos grupos experimentais nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). Significância do 6º dia aos 21 dias nos grupos PCF5 e PCS vs. CF5 e CS, respectivamente (* $p < 0,001$; ** $p < 0,0001$).

O eixo latero-lateral do crânio não demonstrou diferença entre nenhum grupo analisado ($p > 0,05$; Figura 5).

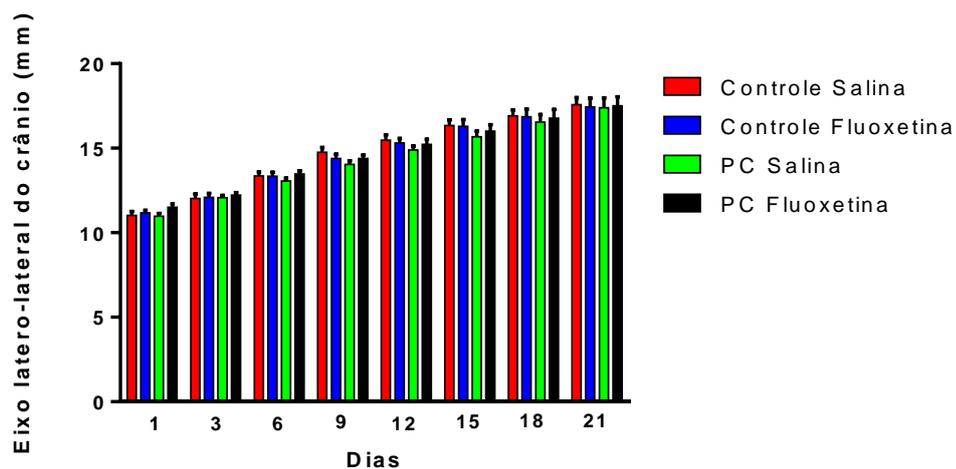


Figura 5. Avaliação do eixo latero-lateral do crânio nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). Sem diferença significativa ($p > 0,05$).

O eixo anteroposterior do crânio não demonstrou diferença significativa na comparação de grupos controles ($p>0,05$). A partir do dia 12 até o dia 21, o grupo PCF5 comparado a CF5 apresentou menor tamanho de eixo ($p<0,05$). O grupo PCS, apresentou diferença significativa do 15º ao 21º dia quando comparado a CS ($p<0,05$). Não houve diferença entre os grupos PC Fluoxetina 5mg/kg ou Salina, podendo-se inferir que há um efeito da PC em ambos os grupos, no entanto, sem interferência do veículo administrado (Figura 6).

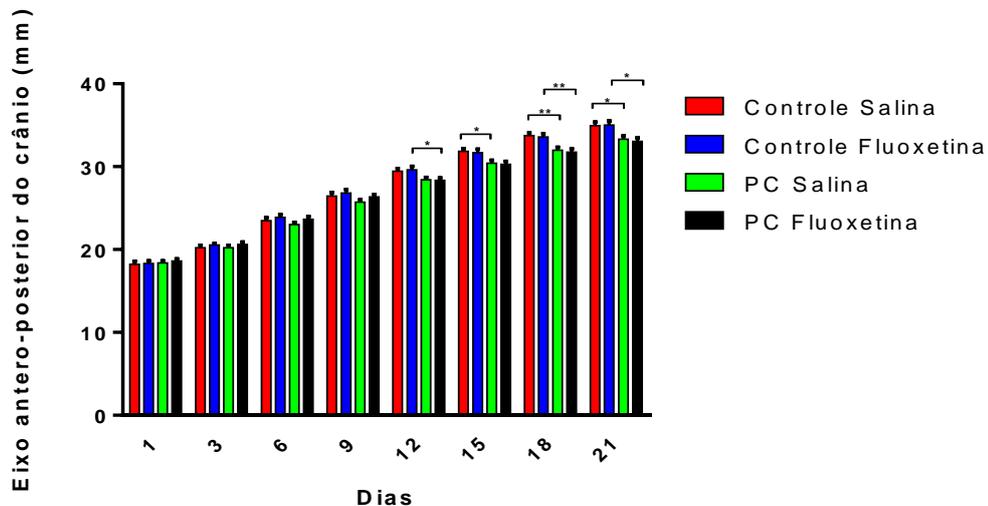


Figura 6. Avaliação do eixo anteroposterior do crânio nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). Significância do 12º dia ao 21 dia nos grupos PCF5 e PCS vs. CF5 e CS, respectivamente (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

O eixo longitudinal dos animais não obteve diferença significativa entre os grupos controles ($p>0,05$). No entanto, a partir do 15º dia, foi verificado menor comprimento do eixo longitudinal nos grupos PCF5 e PCS quando comparado aos seus respectivos controles ($p<0,01$). Esse achado foi observado até o 21º dia ($p<0,001$). Não houve diferença estatística entre os grupos PCF5 e PCS ($p>0,05$; Figura 7).

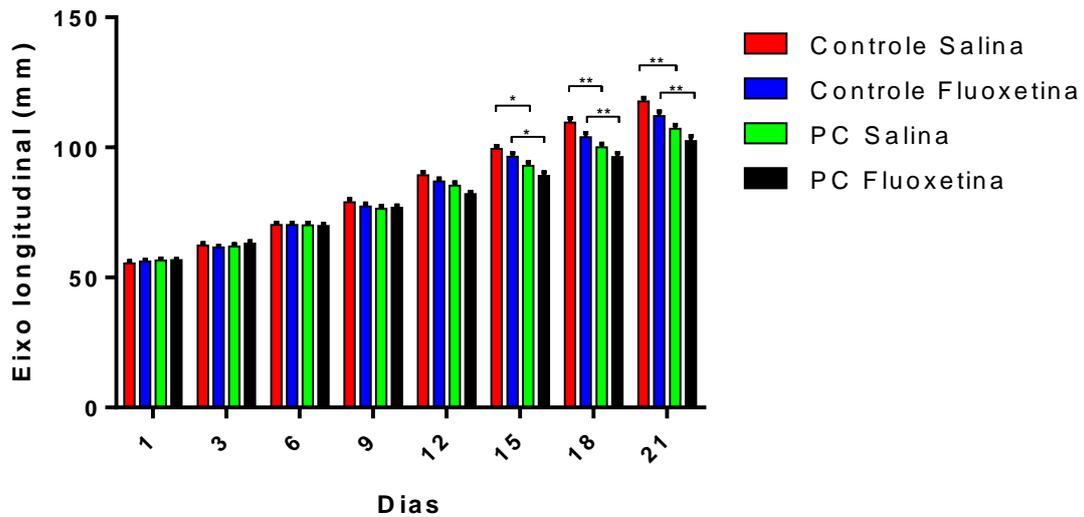


Figura 7. Avaliação do eixo longitudinal nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). Significância do 12º dia ao 21 dia nos grupos PCF e PCS vs. CF e CS, respectivamente (*p<0,01; **p<0,001).

MATURAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

Não foi verificado em nenhum grupo diferença significativa importante, o que pode indicar que não há uma influência nem da paralisia cerebral nem da fluoxetina sobre o a maturação de características físicas (Tabela 1).

Tabela 1. Maturação das características físicas nos grupos experimentais entre os dias 1 e 21 de vida pós-natal.

Maturação de características	Grupos			
	Controle Salina (n=19)	Controle Fluoxetina 5mg (n=19)	PC Salina (n=19)	PC Fluoxetina 5mg (n=18)
Abertura do pavilhão auditivo	2 (2-2)	2 (2-3)	2 (2-3)	2 (2-2.25)
Abertura do conduto auditivo	12 (12-13)	12 (12-13)	13 (12-13)	12 (12-13)
Abertura ocular	13 (12-14)	13 (12-13)	13 (13-13)	13 (12-13)

Erupção de incisivos inferiores	6 (5-8)	6 (5-8)	7 (5-8)	7 (5-8)
Erupção de incisivos superiores	8 (8-9)	8 (7-9)	8 (7-9)	9 (8-10)

Dados expressos em mediana e intervalo interquartil (25%-75%). Sem diferença estatística significativa ($p>0,05$).

ONTOGÊNESE DE REFLEXOS

Na análise da ontogênese de reflexos, os reflexos de preensão palmar, recuperação de decúbito, aversão ao precipício, colocação pelas vibrissas e resposta ao susto não obtiveram diferenças significativas entre nenhum grupo analisado ($p>0,05$; Tabela 2).

O reflexo de queda livre demonstrou que não foi evidenciado significância entre os grupos controles e nem entre o grupo PCF5 vs CF5. No entanto, o grupo PCS quando comparado ao grupo CS demonstrou resultado significativamente mais retardatário no seu aparecimento ($p<0,05$). Esse achado denota o efeito da indução da PC sobre o retardo do aparecimento desse reflexo. Não houve diferença estatística entre os grupos PC ($p>0,05$).

Quanto a geotaxia negativa, também não foram observadas diferenças na comparação entre os controles ($p>0,05$). No entanto, ao comparar os grupos PCF5 vs CF5 e PCS vs CS, foi verificado que houve um aumento no número de dias para esse reflexo aparecer nos grupos paralisia quando comparado aos seus respectivos controles ($p<0,0001$). Supomos que o modelo de paralisia adotado possa influenciar na desenvoltura do animal nesse reflexo. A comparação entre os grupos PCF5 e PCS não evidenciou diferença estatística.

Tabela 2. Análise da ontogênese de reflexos nos grupos experimentais entre os dias 1 e 21 de vida pós-natal

Grupos

Reflexos	Controle Salina (n=19)	Controle Fluoxetina 5mg (n=19)	PC Salina (n=19)	PC Fluoxetina 5mg (n=18)
Preensão palmar	4 (4-5)	4 (3-4)	4 (4-5)	4 (2-4)
Recuperação de decúbito	3 (2-4)	3 (3-4)	3 (2-5)	3 (2-4.25)
Aversão ao precipício	6 (5-7)	5 (4-7)	8 (6-9)	6 (4.75-9.25)
Colocação pelas vibrissas	10 (9-10)	10 (9-10)	10 (9-11)	10 (9-11)
Queda livre	12 (10-13)	12 (12-14)	14 (12-15)*	15 (12.75-15)
Resposta ao susto	12 (12-13)	12 (12-13)	13 (12-13)	12 (12-13)
Geotaxia negativa	11 (10-12)	14 (11-15)	25 (19-25)**	25 (25-25)**

Dados expressos em mediana e intervalo interquartil (25%-75%). O reflexo de queda livre apareceu mais tardiamente no grupo PCS do que no grupo CS ($p^* < 0,05$), assim como a geotaxia negativa nos grupos PC vs respectivos controles ($p^{**} < 0,0001$).

ATIVIDADE LOCOMOTORA

A distância percorrida (Figura 8) e a velocidade média (Figura 9) não demonstraram diferença estatística entre os grupos controles. Aos 14 dias, os animais do grupo PCF5 se locomoveram menos e com menor velocidade quando comparados ao seu controle ($p < 0,01$). Aos 28 dias, também foi verificado que o grupo PCF5 demonstrou diminuição da distância e velocidade em comparação a CF5, bem como o grupo PCS em comparação a CS ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre PCF5 e PCS no quesito distância ou velocidade média, o que pode estar associado a condição do próprio modelo de paralisia utilizado, sem influência da fluoxetina nesses parâmetros.

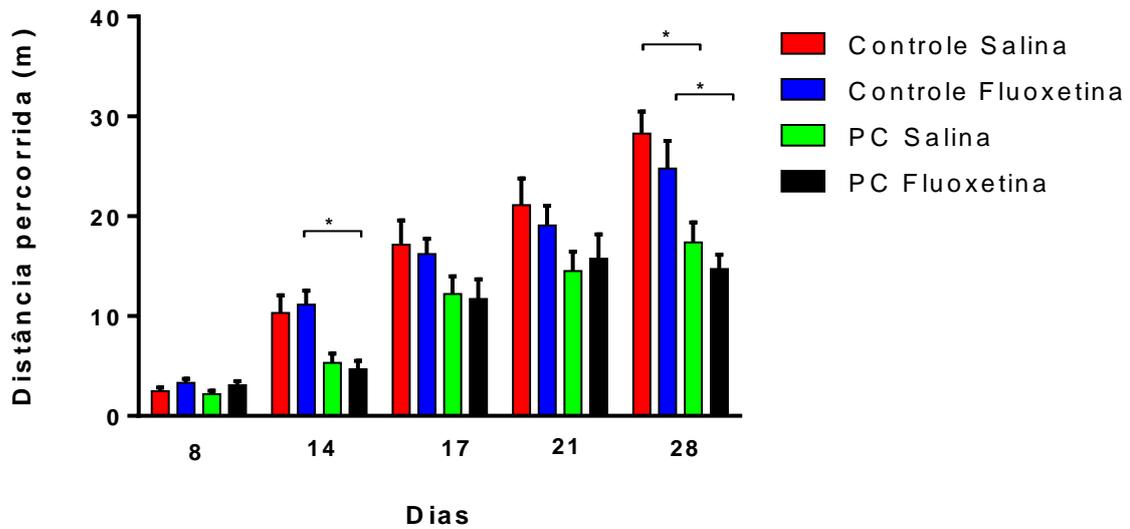


Figura 8 - Distância percorrida (m) pelos grupos experimentais no 8º, 14º, 17º, 21º e 28º dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). A distância percorrida foi menor nos dias 14 e 28 nos grupos PC (*p<0,01).

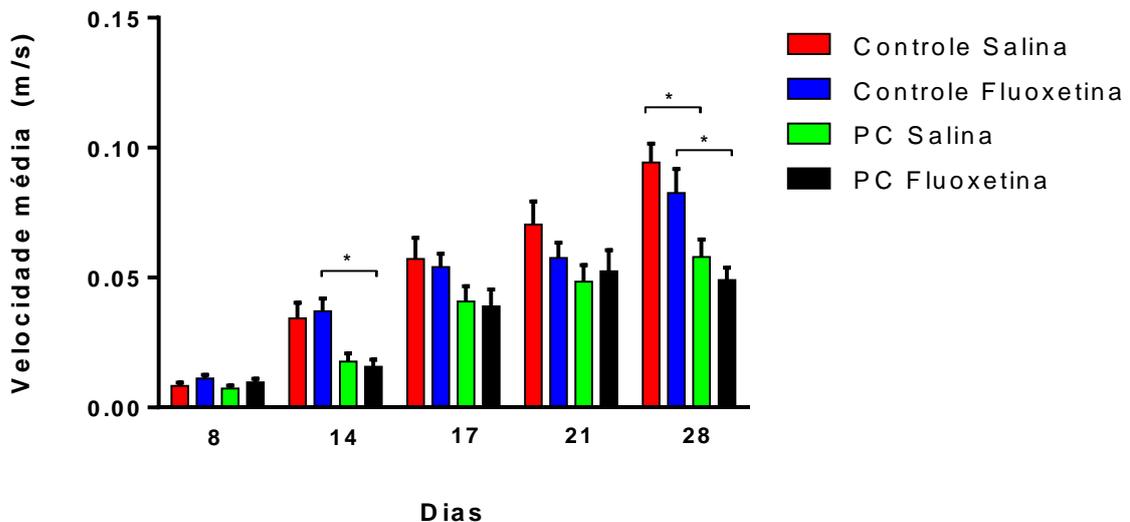


Figura 9 - Velocidade média (m/s) dos grupos experimentais no 8º, 14º, 17º, 21º e 28º dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). Os grupos PC apresentaram menor velocidade média aos 14 e 28 dias em comparação com seus controles (*p<0,01)

A potência média (Figura 10) e a energia cinética (Figura 11) não demonstraram alterações entre os grupos Controles ($p > 0,05$). Contudo, PCF5 vs CF5 e PCS vs CS apresentaram resultados semelhantes aos 14 dias, demonstrando menor potência ($p < 0,01$; $p < 0,05$, respectivamente) e energia cinética ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) nos grupos paralisia. Da mesma forma, aos 28 dias, foi

verificado que a paralisia prejudicou a potência e energia cinética dos animais PC, uma vez que a comparação dos grupos PCF5 e PCS com seus respectivos controles foram estatisticamente significantes ($p < 0,001$; $p < 0,01$ respectivamente). Não houve diferença significativa entre os grupos PCS e PCF5 ($p > 0,05$).

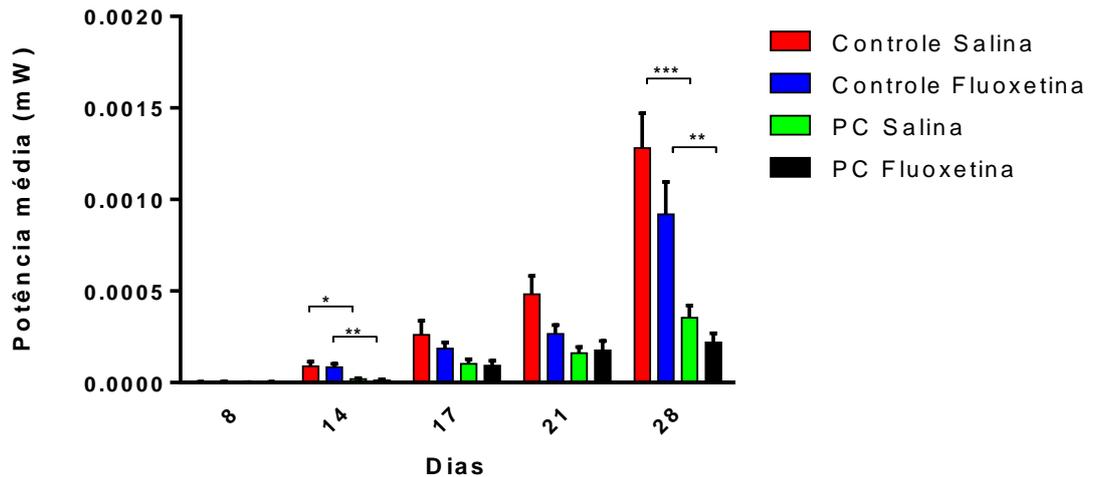


Figura 10 - Potência média (mW) dos grupos experimentais no 8^o, 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). Os grupos PC apresentaram menor potência em comparação aos seus controles nos dias 14 e 28 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

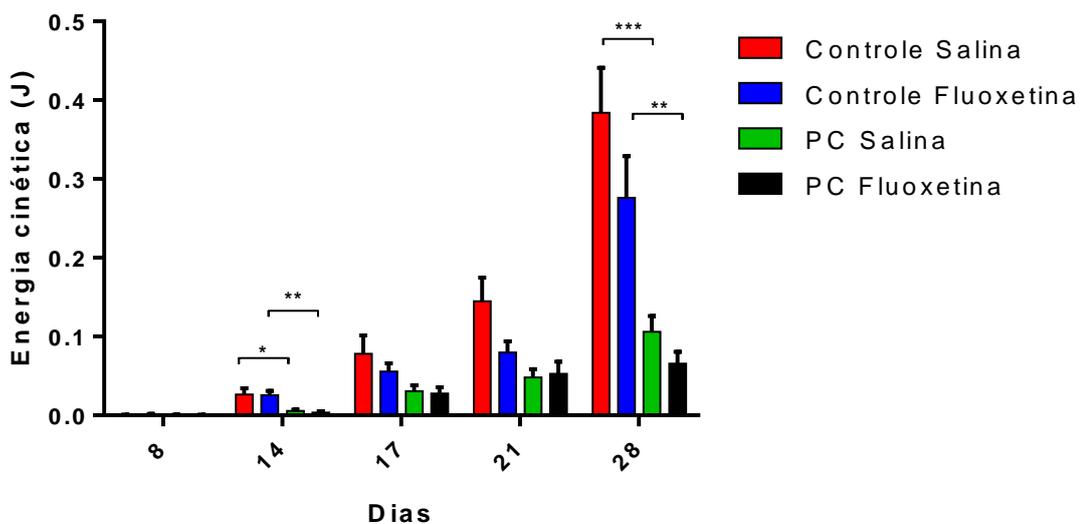


Figura 11 - Energia cinética (J) dos grupos experimentais no 8^o, 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dia de vida pós-natal. CS (n=19), CF5 (n=19), PCS (n=19), PCF5 (n=18). Os grupos

controles apresentaram maior energia cinética em comparação com seus respectivos grupos PC (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

Aos 8 dias, o tempo parado demonstrou que o grupo CF5 permaneceu mais tempo parado do que o grupo CS ($p < 0,05$). No entanto, não houve diferença significativa entre PCF5 e PCS e seus Controles ($p > 0,05$). Com tudo, a comparação entre os grupos PCS e PCF5 verificou que o grupo PCF5 permaneceu menos tempo parado que o grupo PCS ($p < 0,05$). Tais resultados podem insinuar que a fluoxetina tenha influenciado na primeira semana de vida desses animais. Aos 28 dias, não foi verificado diferença entre os grupos controles. Apenas o grupo PCS em comparação ao seu controle demonstrou significância, permanecendo por mais tempo parado ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos PC nessa idade ($p > 0,05$; Figura 12).

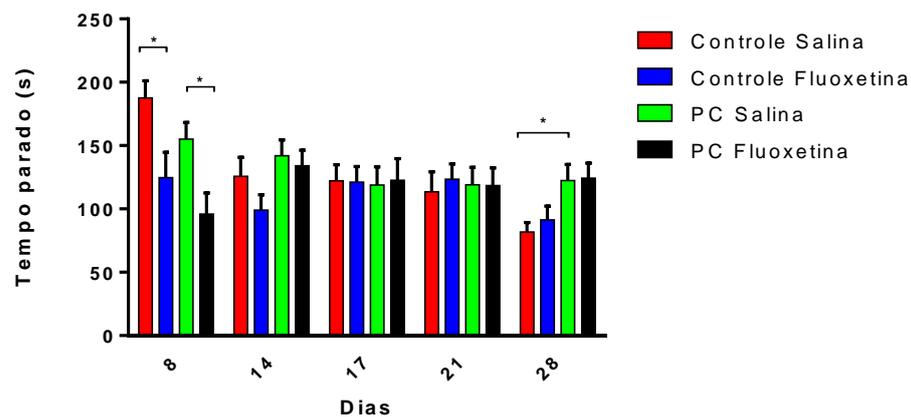


Figura 12 - Tempo parado (s) dos grupos experimentais no 8^o, 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). Aos 8 dias diferença entre comparação de controles e comparação de PC. Aos 28 dias o grupo PC Salina obteve maior tempo parado quando comparado a CS (* $p < 0,05$).

O número de paradas não obteve diferença significativa em nenhum dos grupos ($p > 0,05$; Figura 13).

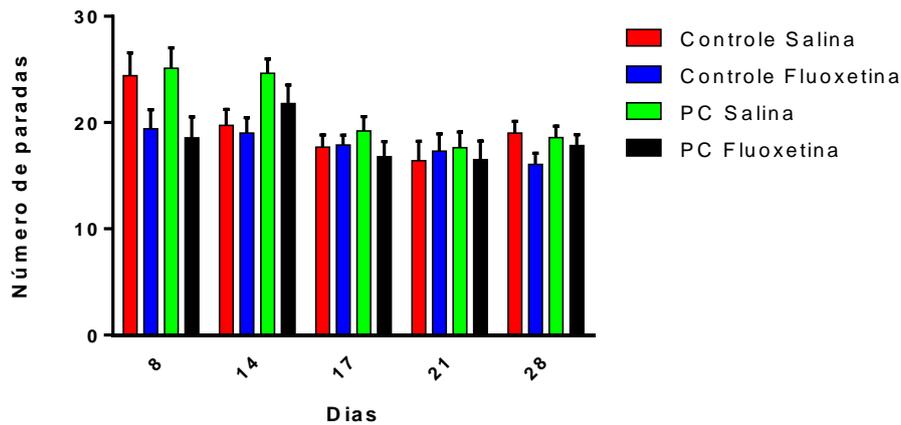


Figura 13 – Número de paradas dos grupos experimentais no 8^o, 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). Não houve diferença estatística ($p>0,05$).

A relação entre tempo parado e número de paradas não demonstrou diferença em nenhum grupo ao longo dos primeiros 21 dias de vida pós-natal ($p>0,05$; Figura 14). No entanto, aos 28 dias, apenas os grupos PCF5 e PCS comparado aos grupos CF5 e CS, respectivamente, demonstraram uma relação maior nos grupos da paralisia ($*p<0,05$; $**p<0,001$; respectivamente).

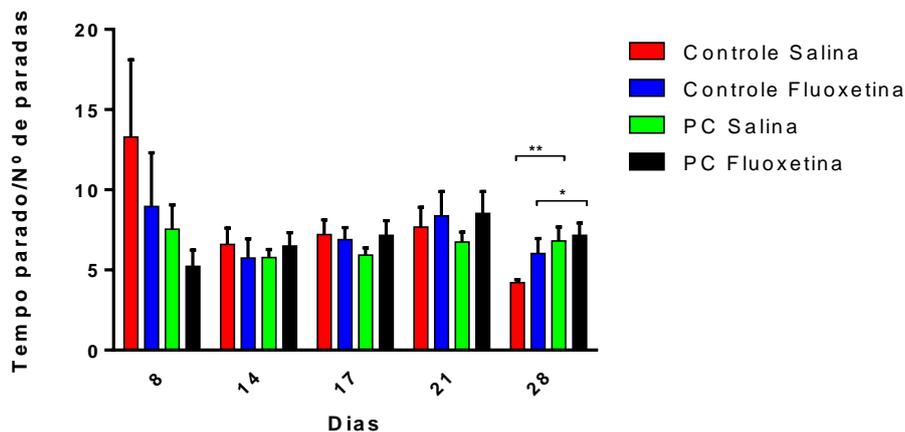


Figura 14 - Relação do tempo parado (s) / número total de paradas (n) dos grupos experimentais no 8^o, 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). Os grupos PC apresentaram maior coeficiente com relação aos seus grupos Controle no 28^o dia ($*p<0,05$; $**p<0,001$).

Com relação ao tempo em cada área, não foi observada diferença significativa quanto ao tempo dos animais na área 1 em nenhum grupo avaliado

($p > 0,05$; figura 15A). Nas áreas 2 e 3, os animais do grupo controle não demonstraram diferença significativa, sendo verificado apenas aos 14 dias que o grupo PCF5 permaneceu mais tempo na área 2 em comparação a CF5 ($p < 0,01$). Além disso, o grupo CF5, permaneceu por mais tempo na área 3 do que o grupo PCF5 ($*p < 0,01$; Figura 15B; 15C). Não houve diferenças entre os grupos paralisia.

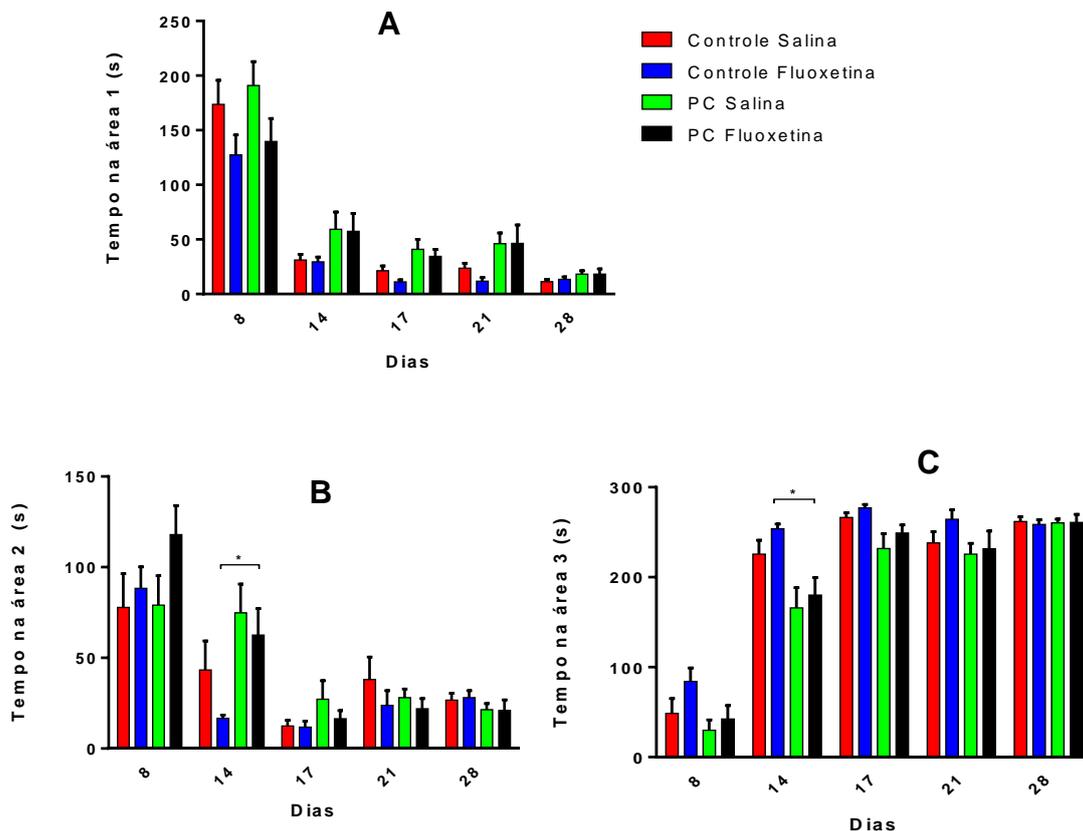


Figura 15 – A) Tempo na área 1; B) Tempo na área 2 e C) Tempo na área 3 no 8^o, 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dia de vida pós-natal: CS (n= 19), CF5 (n= 19), PCS (n= 19), PCF5 (n= 18). O grupo PCF5 passou mais tempo na área 2 e menos tempo na área 3 que o grupo CF5 ($*p < 0,05$).

COORDENAÇÃO MOTORA

A coordenação motora foi avaliada no 29^o dia de vida, não sendo evidenciada diferença entre os grupos controles ($p > 0,05$; Figura 16). No entanto, ao comparar os grupos PC com seus respectivos controles, ambos os grupos PC apresentaram uma latência menor no teste ($*p < 0,01$; $**p < 0,0001$, respectivamente). Não foi verificado diferença entre os grupos PCF5 e PCS ($p > 0,05$).

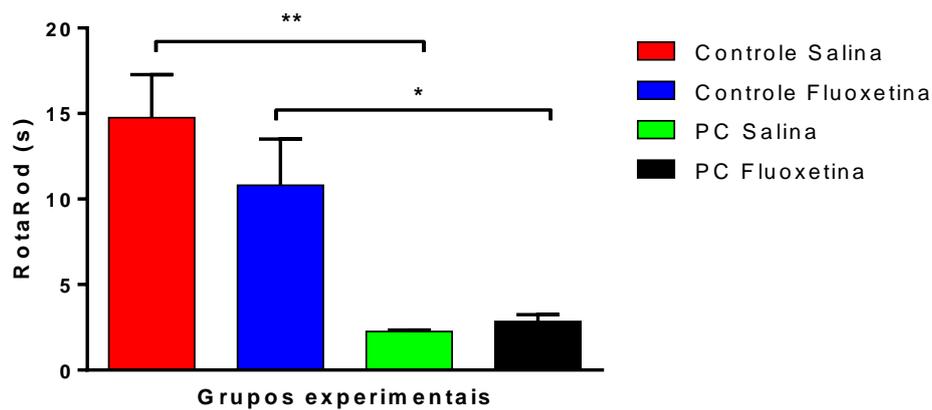


Figura 16. Avaliação da coordenação motora através do Rota-rod (s) de acordo com os grupos experimentais no 29º dia de vida pós-natal: CS (n= 15), CF5 (n= 15), PCS (n = 15) e PCF5 (n =15). A coordenação motora foi menor nos grupos PC comparado com seus respectivos controles (* $p < 0,01$; ** $p < 0,0001$)

FORÇA MUSCULAR

Os testes de força muscular não apresentaram diferença significativas em nenhum grupo ($p > 0,05$; tabela 3).

Tabela 3. Testes de força muscular (GRIP e suspensão) no 28º dia de vida

Testes de força muscular	Grupos			
	Controle Salina (n=15)	Controle Fluoxetina 5mg (n=15)	PC Salina (n=15)	PC Fluoxetina 5mg (n=15)
GRIP (g)	14.33 (10.67-34.67)	21.67 (8.66-38)	26.33 (8-34.67)	33 (10.33-36.33)
Teste de suspensão (s)	33.20 (22.4-54)	30.81 (19.62-45.62)	27.62 (17-46.94)	29.03 (20.63-44)

Dados expressos em mediana e intervalo interquartil (25-75%). Sem diferença estatística importante ($p > 0,05$).

8 DISCUSSÃO

Esses resultados demonstraram as alterações no sistema neuromotor após manipulação de baixa dosagem (5mg/kg) de fluoxetina em ratos submetidos ou não a paralisia cerebral. Foi observado que a associação ou não da fluoxetina em baixa dosagem ao modelo de paralisia cerebral acarreta déficits sobre o peso corporal, desenvolvimento somático, atividade locomotora, coordenação motora e força muscular, revogando a hipótese inicialmente apresentada.

A paralisia cerebral limitou o ganho de peso corporal no nosso estudo. Esse dado corrobora estudos anteriores, que demonstraram limitação no ganho de peso de animais submetidos ao modelo que associa anóxia perinatal e restrição sensório-motora (MARCUIZZO et al., 2010; COQ et al., 2008; SILVA et al., 2016). A atrofia muscular e a baixa densidade óssea decorrentes da restrição sensório-motora pode ter um papel importante na redução do peso corporal desses animais (BURATTI et al., 2019; DELCOUR et al., 2018; MARQUES et al., 2014; SILVA et al., 2016). Além disso, déficits no controle de músculos orofaciais em animais submetidos a modelos de paralisia cerebral contribuem para a incoordenação da sucção e da deglutição, reduzindo a ingestão de dieta e conduzindo a um baixo estado nutricional, repercutindo no peso corporal dos animais (LACERDA et al., 2017b). No entanto, não parece haver influência da fluoxetina sobre o peso corporal. Dessa forma, assim como observado em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa, foi observado que a suplementação com triptofano, um aminoácido precursor de serotonina, não demonstrou diferença entre o grupo PC Triptofano e o grupo PC salina, corroborando nosso achado e sugerindo o impacto que o modelo de paralisia cerebral exerce sobre o peso corporal (LACERDA et al., 2019).

Concomitante aos achados do peso corporal, a avaliação das características murinométricas foi afetada pela PC. Levando-se em consideração que o peso corporal dos animais nos grupos paralisia foi limitado, supomos que houve uma restrição real do ganho de peso corporal, repercutindo no tamanho do animal. É possível que a paralisia cerebral influencie de forma direta nas medidas corporais desses animais e que a fluoxetina não tenha nenhuma influência sobre tais medidas. Esses achados corroboram resultados já encontrados, onde as repercussões do modelo estudado como baixo peso corporal e atrofia muscular estão presentes e influenciam o desenvolvimento do animal com PC (MARCUIZZO et al., 2010).

Na avaliação da maturação de características físicas não foi observada diferença estatística, estando os animais dentro das idades típicas esperadas para os marcos do desenvolvimento (HEYSER, 2003). No entanto, no estudo de Toso et al. (2005), foi verificado nos animais com paralisia cerebral um atraso na abertura ocular em comparação aos animais do grupo controle, supondo-se que o modelo de indução inflamatório utilizado tenha retardado o desenvolvimento da via visual no cérebro. Esse achado não foi observado no estudo, dessa forma, acreditamos que houve implicações da PC e nem da fluoxetina em baixa dosagem sobre a maturação das características físicas dos animais.

Não houve alterações nos reflexos de preensão palmar, recuperação de decúbito, aversão ao precipício, colocação pelas vibrissas e resposta ao susto, sugerindo que não houve imaturidade no desenvolvimento do cérebro com relação a esses testes reflexos (NGUYEN; ARMSTRONG; YAGER, 2017). No entanto, a paralisia cerebral demonstrou influenciar o reflexo de queda livre, sugerindo que tal anormalidade no resultado encontrado possa ser fator preditivo de deficiência do desenvolvimento do sistema vestibular (NGUYEN; ARMSTRONG; YAGER, 2017). No teste de geotaxia negativa, a PC parece influenciar o aparecimento desse reflexo, retardando a sua manifestação, sendo possível que a PC acarrete em um comprometimento sensório-motor (STIGGER et al., 2013; TOSO et al., 2005). Além disso, o modelo de paralisia utilizado no nosso estudo, por associar a restrição sensório-motora que acarreta em rigidez articular e atrofia das patas posteriores, pode ter influenciado e sensibilizado o desenvolvimento do teste (MARCUIZZO et al., 2010). Entretanto, não parece haver influência da fluoxetina em baixa dosagem sobre a geotaxia negativa. Tal resultado difere dos já encontrados por Deiró et al. (2008), que utilizou um inibidor seletivo de recaptção de serotonina, o citalopram (10mg/kg), e verificou atraso no aparecimento de geotaxia negativa, sugerindo influência da via serotoninérgica nos marcos do desenvolvimento ao utilizar doses mais elevadas. Assim, pelo que foi observado até o momento, a utilização de baixa dose de fluoxetina parece não acarretar em alterações somáticas e reflexas em animais submetidos a PC.

A avaliação da atividade locomotora foi realizada em campo aberto, os parâmetros de distância percorrida e velocidade média demonstraram piores resultados sobre a PC. Esse achado demonstra haver uma influência do modelo de paralisia cerebral assim como já foi observado em estudos anteriores (MARCUIZZO

et al., 2008; SILVA et al., 2016; STIGGER et al., 2011; STRATA et al., 2004). Os modelos que associam restrição sensorio-motora faz com que o animal desenvolva um padrão extensor predominante nas articulações das patas posteriores, além de aumento da angulação da articulação do tornozelo, atrofia muscular, principalmente do músculo sóleo associado a diminuição de fibras do tipo I (MARCUIZZO et al., 2008; SILVA et al., 2016; STIGGER et al., 2011; STRATA et al., 2004). A associação desses resultados observados nesse modelo, leva a alterações graves no desenvolvimento da atividade locomotora assim como observado no nosso estudo. Além disso, até o 14º dia de vida pós natal animais sem patologias, normalmente apresentam uma velocidade de locomoção mais baixa, característica do processo de desenvolvimento (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993), e que vai aumentando com o passar da maturação de estruturas neurais e musculares (ARAGÃO et al., 2011). Todavia, não somente a PC acarreta em complicações ao deslocamento e velocidade média, mas também a fluoxetina pode ter influenciado tais parâmetros. Sugere-se que medicamentos podem alterar o comportamento emocional de animais, alterando o movimento (ARAGÃO et al., 2011), assim, é possível que a manipulação pudesse desempenhar um estado de torpor, reduzindo a distância e velocidade pelo uso de fluoxetina.

A potência média e a energia cinética também diminuíram sobre a PC. Foi observado em Silva et al. (2016) que a potência média e a energia cinética também diminuíram no grupo PC. Tais parâmetros avaliados são medidas diretamente proporcionais ao peso corporal dos animais (SILVA et al., 2016). Dessa forma, alterações no peso corporal do animal, como encontrado em nosso estudo, pode alterar a potência e a energia cinética. Assim, em decorrência dessa associação, a potência média e a dissipação de energia cinética também diminuíram. Um outro fator envolvido nesse achado é a diminuição da velocidade média presente nesses grupos de animais que pode estar associada a tais resultados, uma vez que a potência e a energia também são diretamente proporcionais à velocidade (ARAGÃO et al., 2011; SILVA et al., 2016).

O parâmetro de tempo parado demonstrou na primeira semana que os animais em geral permaneceram imóveis. A primeira semana de vida dos animais é marcada por pouca função de locomoção e eles tendem a se movimentar por rastejamento devido a processos de maturação ainda em desenvolvimento (WESTERGA; GRAMSBERGEN, 1993). Devido aos resultados encontrados, parece

que a fluoxetina desempenhou um papel estimulante na primeira semana de vida, uma vez que os grupos em que houve manipulação da droga permaneceram menor tempo parado, no entanto, não está claro de que forma ocorreu pois não foi um efeito duradouro. Além disso, outros estudos já demonstraram um menor tempo de mobilidade em animais submetidos a hipoxemia (BURATTI et al., 2019; SILVA et al., 2016), corroborando nossos achados sobre a influência da PC no desenvolvimento da atividade locomotora.

O tempo em cada área demonstrou que os animais permaneceram mais na área 1 até os oito dias de vida, e a partir da segunda semana nas áreas 2 e 3. Isso ocorre, pois a primeira semana de vida dos animais há pouca maturação neural e muscular, o que implica em padrões de marcha imaturo, fazendo com o que o animal se locomova pouco e fique em áreas mais centrais, somente com o passar do tempo tendem a ir para áreas mais periféricas, explorando o campo (ARAGÃO et al., 2011).

A coordenação motora foi avaliada no 29º dia por meio do teste de rotarod, que permite avaliar habilidades musculoesqueléticas dos animais (TOSO et al., 2005). No nosso estudo, houve diferença nos animais pertencentes aos grupos PC. Animais submetido a hipóxia-isquemia ao realizarem o teste de rotarod demonstraram menor latência de queda, assim como foi observado nos nossos resultados, sugerindo uma coordenação prejudicada (MARQUES et al., 2014; ZAGHLOUL; PATEL; AHMED, 2017). Para Marcuzzo et al. (2010), embora tenha utilizado outros testes (escada horizontal e caminhada em viga) para análise do desempenho motor, observou-se que os grupos submetidos a anóxia e restrição sensório-motora tiveram menor desempenho. Corroborando a resultados também já encontrados, a rigidez da articulação das patas posteriores compromete o desempenho motor dos animais (STIGGER et al., 2011b; STRATA et al., 2004).

Os testes de força muscular não demonstraram diferenças significativas. No entanto, foi verificado no teste GRIP, um teste cujo objetivo é registrar em gramas o pico de força de preensão das patas anteriores do animal, que os animais com PC apresentaram força maior do que seus respectivos controles. Uma hipótese que pode ajudar a entender tal resultado pode estar associada ao modelo de paralisia cerebral utilizado, pois como já visto em estudos anteriores (MARCUIZZO et al., 2008; SILVA et al., 2016; STIGGER et al., 2011; STRATA et al., 2004) e também no nosso estudo, a restrição sensório motora leva a alterações musculoesqueléticas

que comprometem a locomoção desses animais. Dessa forma, a mudança no tipo de fibras encontradas em músculos das patas posteriores, com prevalência de fibras do tipo II, que são fibras rápidas e mais fatigáveis pode estar associada ao que foi observado nesse teste (MARCUIZZO et al., 2010b; STIGGER et al., 2011). Assim, supomos que o mesmo possa ter ocorrido em músculos da pata anterior, uma vez que no teste de suspensão, um teste que exige manutenção da força do animal por um período máximo de um minuto, os animais PC apresentaram valores menores que os seus controles. No entanto, tais resultados diferem de outros estudos que utilizaram apenas modelos de hipóxia isquemia sem a restrição de patas posteriores (KIM et al., 2017b; ZAGHLOUL; PATEL; AHMED, 2017), onde animais pertencentes ao grupo hipóxia ao realizarem o teste GRIP apresentaram diminuição da força de preensão de patas anteriores comparado a ratos que não sofreram hipóxia.

**APÊNDICE A – ARTIGO ORIGINAL PROVENIENTE DOS DEMAIS RESULTADOS
OBTIDOS NA DISSERTAÇÃO - SUBMETIDO A REVISTA EXPERIMENTAL
NEUROLOGY**

**Neonatal Treatment with Low Dose of Fluoxetine Attenuates Adverse Effects
on Somatosensory Cortex of Rats Subjected to an Experimental Cerebral Palsy**

Gláyciele Leandro de Albuquerque^{a,b}, Raul Manhães-de-Castro^a, André Teracio Bezerra de Moraes^{a,c}, Caio Matheus Santos da Silva Calado^a, Diego Cabral Lacerda^{a,d}, Ana Elisa Toscano^{a,e}

^aUnit of Studies in Nutrition and Phenotypic Plasticity, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ^bGraduated in Physiotherapy, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ^cMasters in Physiotherapy, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ^dPost Graduate Program in Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil; ^eDepartment of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

ABSTRACT

Purpose Cerebral Palsy (CP) is characterized by motor disorders, including deficits in locomotor activity, coordination and balance. Motor impairments are result of injuries in somatosensory cortex (S1). This study investigates the therapeutic potential of fluoxetine to reduce damage in histomorphometric parameters of the S1 in rats subjected to an experimental model of CP. **Methods** 107 Wistar rats were used. Pups were randomly assigned to 6 experimental groups: Saline Control, Fluoxetine Control 10mg, Fluoxetine Control 5mg, CP Saline, CP Fluoxetine 10mg and CP Fluoxetine 5mg. The experimental model of CP was based on combination of perinatal anoxia associated with sensorimotor restriction of the hindpaws. Fluoxetine was administered subcutaneously during lactation period. The analysis of body weight was performed daily during the lactation period and histomorphometric assessment of S1 on the 29th day of postnatal life. **Results** The use of fluoxetine in high dosage (10mg / kg) limited body weight gain, decreased the number of neurons and increased the number of glial cells in S1. Conversely, the use of a lower dosage (5mg / kg) did not affected body weight, decreased the number of glial cells and glial / neuron index, in rats subjected to CP. **Conclusion** These results demonstrate that

experimental CP impaired the histomorphometric parameters of S1 and that treatment with low dose of fluoxetine (5mg / kg) attenuated the S1 injuries in animals subjected to CP.

Keywords: Cerebral Palsy; Sensorimotor Cortex; Neurons; Neuroglia; Fluoxetine

Introduction

Cerebral Palsy (CP) is considered a group of permanent movement, posture and muscle tone disorders, which causes limitations in daily activities (ANDREW et al., 2015). This nervous disorder is caused by an injury that manifests itself during brain development (VITRIKAS; DALTON; BREISH, 2020). CP is characterized by clinical signs such as spasticity, dyskinesia, hyperreflexia, developmental delay, deficit in muscle strength, lack of coordination and problems with balance and gait (RICHARDS; MALOUIN, 2013). These motor disorders are often accompanied by changes in sensation, perception, cognition, communication and behavior (ANDREW et al., 2015).

The signs and symptoms of CP result of injuries of multiple segments of the nervous system, such as the pyramidal tract, extrapyramidal tract, cerebellum and cerebellar pathways, brainstem, cerebral cortex and subcortical structures (DERRICK et al., 2004; SAADANI-MAKKI et al., 2008). The injury caused by CP results in neuronal loss due to apoptosis, reduced dendritic arborization, truncated dendritic arborization and, consequently, decreased brain mass (ROCHA-FERREIRA; HRISTOVA, 2016). Associated with damage to the number and structure of neurons, CP promotes profound changes in the activity of glial cells. The activation of microglia and oligodendrocytes promote neuronal injury, hypomyelination and neuronal loss in noble areas of the nervous system (KANNAN et al., 2011b; SAADANI-MAKKI et al., 2008). An increase in the number and hypertrophy of astrocytes is also observed in multiple areas of white matter, including the periventricular area (CHUA et al., 2009). These findings impair the blood supply and the availability of oxygen and glucose in the nervous tissue (BENFER et al., 2012). In consequence to neural damage, children with CP present motor control impairment, reduction in the number of effective motor units, muscle atrophy and weakness (GOLDSTEIN, 2001; KOMAN; SMITH; SHILT, 2004). In addition, the reduction in

cortical descending impulses increases the excitability of alpha and gamma motoneurons, which results in spasticity (GOLDSTEIN, 2001). Thus, the damage to the nervous system induced by CP cause metabolic, cognitive, locomotor, coordination and mental development disorders.

Serotonin (5-HT) plays an important role in the different phases of brain development that include cell division, neuronal migration, cell differentiation and synaptogenesis (AZMITIA, 2001b; GASPAR; CASES; MAROTEAUX, 2003). Evidence has shown that the development of the serotonergic system is impaired in several experimental models of CP (BULLER; WIXEY; REINEBRANT, 2012). Experimental models of CP caused a reduction in 5-HT levels as well as a decrease in serotonergic neurons in the somatosensory cortex (S1) and hippocampus (KANNAN et al., 2011b). In addition, the induction of CP, using models of maternal inflammation, promoted changes in the metabolism of tryptophan, the 5-HT precursor amino acid, leading to the activation of microglia and excitotoxic lesions, which resulted from the production of oxidative stress markers (WILLIAMS et al., 2017b; ZHANG et al., 2019). Similar findings were also observed in rats subjected to hypoxia-ischemia (HI), during the first days of postnatal life (BULLER; WIXEY; REINEBRANT, 2012). The affected areas included the primary motor cortex (M1) and mainly in S1 (REINEBRANT; WIXEY; BULLER, 2012). Furthermore, CP causes a disorganization in the areas of cortical representation in S1 (STIGGER et al., 2011). Therefore, the impact on the serotonergic system in S1 seems to play an important role in the appearance of sensorimotor deficits typical of CP (WILLIAMS et al., 2017b).

Conversely, the increase in 5-HT levels in the synaptic cleft contributes to the development of parameters that reflect the integrity of the nervous system (CHANG; HAVTON, 2013). Serotonergic activity plays a crucial role in the mechanisms that control development both from a phylogenetic and ontogenetic point of view of the nervous system (AZMITIA, 2001b). Furthermore, the manipulation of this system seems to protect neural cells from oxidative stress during brain development (DA SILVA et al., 2014). This interesting evidence suggests a protective role for neural development associated with serotonergic activity. Experimental studies have shown that selective 5-HT reuptake inhibitors (SSRIs) increased the production of brain-derived neurotrophic factor which plays an important role in survival, neuronal remodeling and differentiation (DE FOUBERT et al., 2004; KARPOVA et al., 2011;

LIU et al., 2014b). In addition, experimental studies indicate that SSRIs can regenerate hippocampal neurons, which provides recovery of neurological function (KUBERA et al., 2009; LEE et al., 2004; LI et al., 2009).

The administration of the drug fluoxetine has been widely used in experimental studies to increase brain levels of 5-HT (DA L.D. BARROS et al., 2018). High neonatal doses (> 10mg / kg) of fluoxetine appear to exacerbate functional deficits in adult rats with hypoxic-ischemic brain injury (CHANG et al., 2006). There is evidence that showed that the use of high doses resulted in neurobehavioral consequences, such as increased emotional reactivity and changes in the motivational system, in addition to low weight (CAGIANO et al., 2008b). Conversely, a previous study has demonstrated that the neonatal use of low doses (5mg / kg) of fluoxetine, has benefits in neuroplasticity, reducing the functional deficit in rats with hypoxic-ischemic brain injury and without adverse effects on cognition or on long-term behavior (CHANG et al., 2006). However, the effects of fluoxetine administration, especially in low doses, on reducing nervous tissue damage in an experimental model of CP remains unclear.

Encouraging findings already show that manipulation of the serotonergic system has been indicated as a therapeutic resource for the treatment of motor damage in other vascular and nerve pathologies, such as stroke and depression, which suggest the possibility of similar improvements in CP (BUDHDEO; RAJAPAKSA, 2011). Thus, we hypothesized that an increase in serotonergic activity induced by neonatal treatment with low doses of fluoxetine, attenuate neural damage in S1 in animals subjected to experimental CP.

Materials and methods

Animals

This is a controlled and randomized experimental study, developed in Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco (UFPE) (Brazil), between July 2018 and July 2019. This study was approved in June 2018 by the Ethics Committee on Animal Use of the UFPE Biosciences Center (CEUA-CB / UFPE) with registration 0015/2018. All animal experiments were in accordance with the ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) Guidelines and the guidelines

established by the EU Directive 2010/63 / EU on the protection of animals used for scientific purposes.

A total of 107 Wistar albino rats were obtained from 30 litters. The animals were maintained at a temperature of $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, inverted light-dark cycle of 12/12 hour and free access to filtered water and food (labine diet). Each litter was composed of 8 male puppies and body weight and S1 assessments was performed only in male puppies. At birth, the animals were randomly assigned to the following groups: Control Saline (CS, n = 19), Control Fluoxetine 10mg / kg (CF10, n = 16), Control Fluoxetine 5mg / kg (CF5, n = 19), CP Saline (CPS, n = 19), CP Fluoxetine 10mg / kg (CPF10, n = 16) and Cerebral Fluoxetine 5mg / kg (CPF5, n = 18).

From the 1st to the 21st day of life, fluoxetine (5 or 10 mg / kg) or saline solution was administered according to each experimental group. The drug was administered subcutaneously on the animal's dorse, daily, at 9:00 am. The drug was obtained in the form of Fluoxetine Hydrochloride (Bristol-USA®) and dissolved in a control vehicle, a 0.9% saline solution (NaCl). The doses used were selected from a previous study that demonstrates the therapeutic potential of low-dose fluoxetine in animals subjected to hypoxia-ischemia(CHANG et al., 2006). For the control group, 0.9% sodium chloride solution (NaCl) was used.

Experimental model of CP

The experimental model of CP (COQ et al., 2008; STIGGER et al., 2011; STRATA et al., 2004) was based on combination of perinatal anoxia with sensorimotor restriction of the hindpaws. The animals of the CP groups were subjected to two episodes of anoxia: on the day of birth (P0) and on the first day of life (P1). From P2 to P28, the sensorimotor restriction of hindpaws was performed for 16 hours a day. For the sensorimotor immobilization, it was used an orthosis that allowed only limited movements of the hip joint, with hindpaws extended. The elimination of feces and urine and maternal care were not affected during immobilization period (STRATA et al., 2004).

Measurement of body weight

To evaluate the effects of CP induction and neonatal treatment with fluoxetine on the physical development of animals, their body weight was measured at several

postnatal days (P1, P8, P14, P17 and P21) using a digital electronic scale (Mars, capacity of 1 kg and sensitivity of 0.01 g).

Transcardiac perfusion and brain removal

At P29, the animals were deeply anesthetized with ketamine and xylazine (50mg / kg,) to perform the transcardiac perfusion. After opening the thoracic cavity, a cannula for infusion was inserted into the left ventricle. The cannula was then coupled to a peristaltic pump that was activated at a speed compatible with maintaining the integrity of blood vessels. Initially, 150 ml of buffered saline in phosphate buffer was infused. The saline infusion was followed with an infusion of 200 ml fixative solution (4% paraformaldehyde). At the end of the fixator passage, the brain was removed from the skull and post-fixed in the same fixative solution overnight and then placed in sucrose (20%) for 24-48 hours and then stored in a freezer at -80° and cryosection.

Histomorphometric analysis of the S1

The brains were cryosectioned in coronal sections of 20 µm thick using cryostat (Leica®). Five series of coronal sections were collected for each animal, placed in an albuminized acrylic plate (25 cavities). The sections obtained were stained with Hematoxylin-Eosin (HE) to observe the histological characteristics to show neurons and glial cells. Images of the representation of the lower limb in the S1 area were captured and digitized (in 40x for cell count in layer V), identified through stereotaxic coordinates (-2.28 mm of bregma). The microscopic fields were obtained using an OLYMPUS optical microscope model U-CMAD-2 (20x objective) coupled to a program for capturing images. For cell counting, the software IMAGEJ version 1.8.0_172 was used. In each cut, 10 fields were counted (five in the right hemisphere and five in the left). Neurons were identified by their size, which is generally larger and non-spherical in outline. Glial cells were identified by their smaller size and spherical appearance. The glia-neuron ratio was calculated as the proportion of glial cells by neurons (MARCUIZZO et al., 2010a).

Statistical analysis

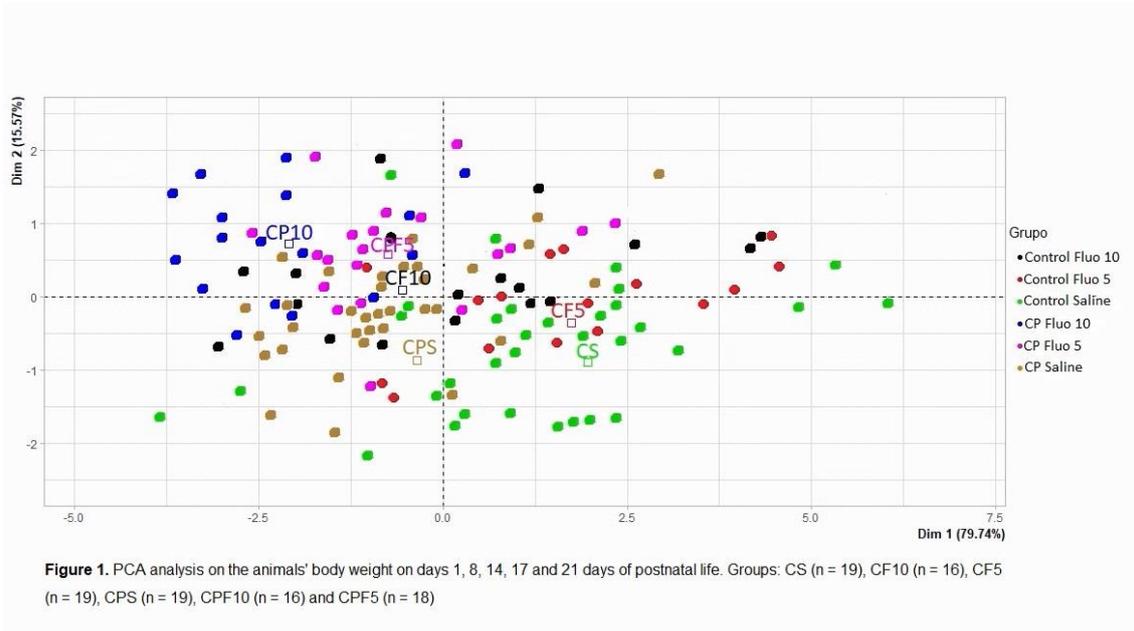
Data analysis and statistics were performed using R (The R Foundation for Statistical Computing, Institute for Statistics and Mathematics, Wien, Austria). The

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 two-way ANOVA and Tukey post hoc tests for S1 cortex analysis. 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 2 sets of variables, including (1) body weight during 5 time periods of body weight measurement (P1, P8,P14,P17 and P21),(2) S1 analysis (number of neurons, number of glial cells and glia / neuron index). 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 2 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 6 groups using R.

Results

Body Weight

PCA was performed to quantify individual scores along PC1 from the 5 variables dealing body weight analysis during lactation period (P1, P8, P14, P17, P21) [F (5,132) = 10.78; P <0.005]. The score of the CPS group (-4 ± 0.5) differed from the CS group (10 ± 0.1). In addition, the score of the CPF10 group (-19 ± 0.2) differed from the animals of the CPS and CF10 groups (-1 ± 0.4). However, no difference was observed between the CPF5 group (0.5 ± 0.4), compared with the CPS and CF5 groups. These data suggest an impact of CP and fluoxetine at a dose of 10mg/kg on body weight (Tukey post test P <0.01; Figure 1), but not specific impact of fluoxetine at a dose of 5mg/kg.



The animals' body weight increased gradually in all experimental groups from the 1st to the 21st day of postnatal life. The induction of CP as well as the pharmacological manipulation with fluoxetine (10mg/kg) limited the body weight gain, when compared with their respective control groups (Post hoc test of Tukey: $P < 0.05$; Figure 2). When comparing the CPS group to the CS group, the body weight of the CPS animals was significantly lower after the 8th day of life (Tukey's post hoc test: $P < 0.01$), which demonstrate the impact of CP on body weight. A significant difference was observed between CF10 vs. CS from the 14th day of life (Tukey post hoc test: $P < 0.01$). However, there was no difference between CF5 and CS (Tukey's post hoc test: P : N.S.), suggesting that only 10mg/kg of fluoxetine limits body weight gain. In addition, from P8 to P21, the body weight of CPF10 rats was significantly lower than the CPS group (Tukey's post hoc test: $P < 0.01$), with no statistically significant difference when comparing CPF5 and CPS (Post hoc test of Tukey: P : NS). Thus, the induction of CP and/or fluoxetine administration at dose of 10mg/kg resulted in an impact on the weight gain, but not specific impact of fluoxetine at a dose of 5mg. These data suggest that low dose of fluoxetine (5mg/kg) did not result in a delay in the somatic development of the animals.

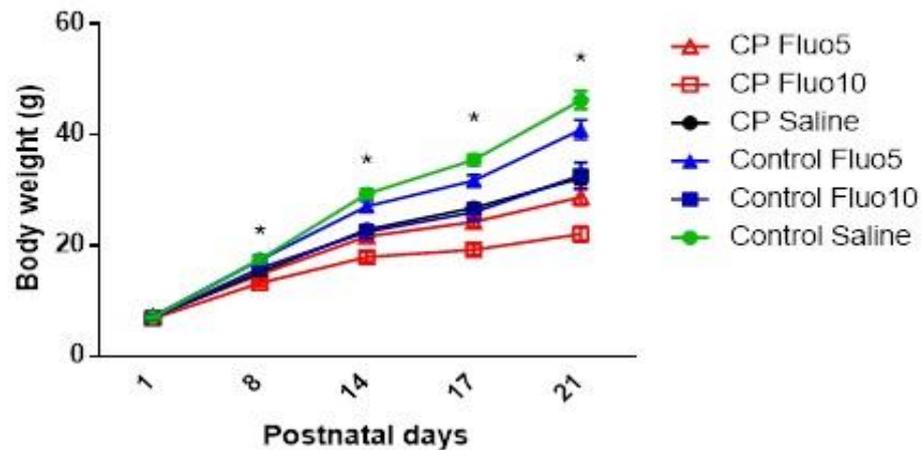


Figure 2. Effect of CP and Fluoxetine on the animals' body weight (g) after birth of CS (n = 19), CF10 (n = 16), CF5 (n = 19), CPS (n = 19), CPF10 (n = 16) and CPF5 (n = 18) rats on 1, 8, 14, 17 and 21 days of postnatal life. The animals' body weight increased gradually over the days. However, induction of CP and/or treatment with fluoxetine (10mg/kg) limited body weight evidenced during lactation period (* P < 0.01).

Histomorphometric analysis of S1

Neurons and glial cells were individually counted in both hemispheres in S1, with neurons identified by their larger size and glial cells identified by being smaller and spherical format. Figure 3 shows the captured images obtained by microscopic field of each area of the S1 hemispheres of the CS (A), CF10 (B), CF5 (C), CPS (D), CPF10 (E), CPF5 (F) groups.

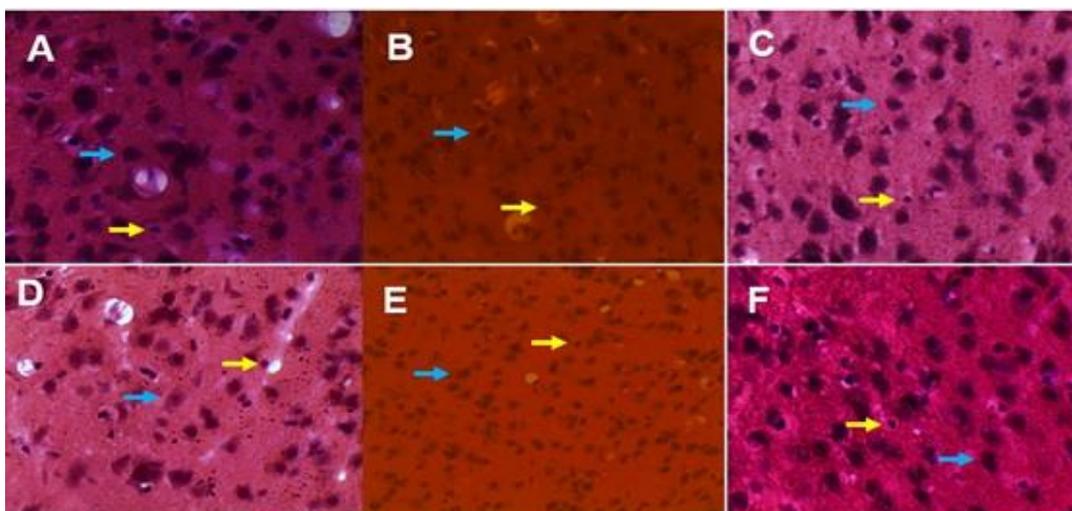


Figure 3. Microscopic images representative of the S1 area stained with HE showing neurons (blue) by the larger shape with non-spherical outline and glial cells (yellow) identified by their spherical size and smaller in the CS = 11 groups (A), CF10 = 5 (B), CF5 = 8 (C), CPS = 13 (D), CPF10 = 4 (E), CPF5 = 8 (F).

PCA was performed to quantify the individual scores along the PC1 involving the 3 variables related to the histomorphometric analysis of the S1 cortex (number of neurons, number of glial cells, glial / neuron index) [$F(5.43) = 32.15$; $P < 0.005$]. The scores of animals in the CF10 group (18 ± 0.1) differed from the CS (-1 ± 0.2) and CF5 (-17 ± 0.2) groups. Regarding the administration of fluoxetine in animals submitted to CP, the score of the animals in the CPS group (6 ± 0.1) differed from the score of the animals in the CPF10 (21 ± 0.6) and CPF5 (-9 ± 0.8) groups. These data suggest that treatment with fluoxetine at a dose of 10 mg/kg intensified, and at a dose of 5 mg/kg attenuated the deleterious effects of CP on histomorphometric parameters of S1 (Tukey post-test $P < 0.01$; Figure 4). In addition, according to the PCA, the variable that most contributed to the variability of the results was the glial/neuron index (Figure 4).

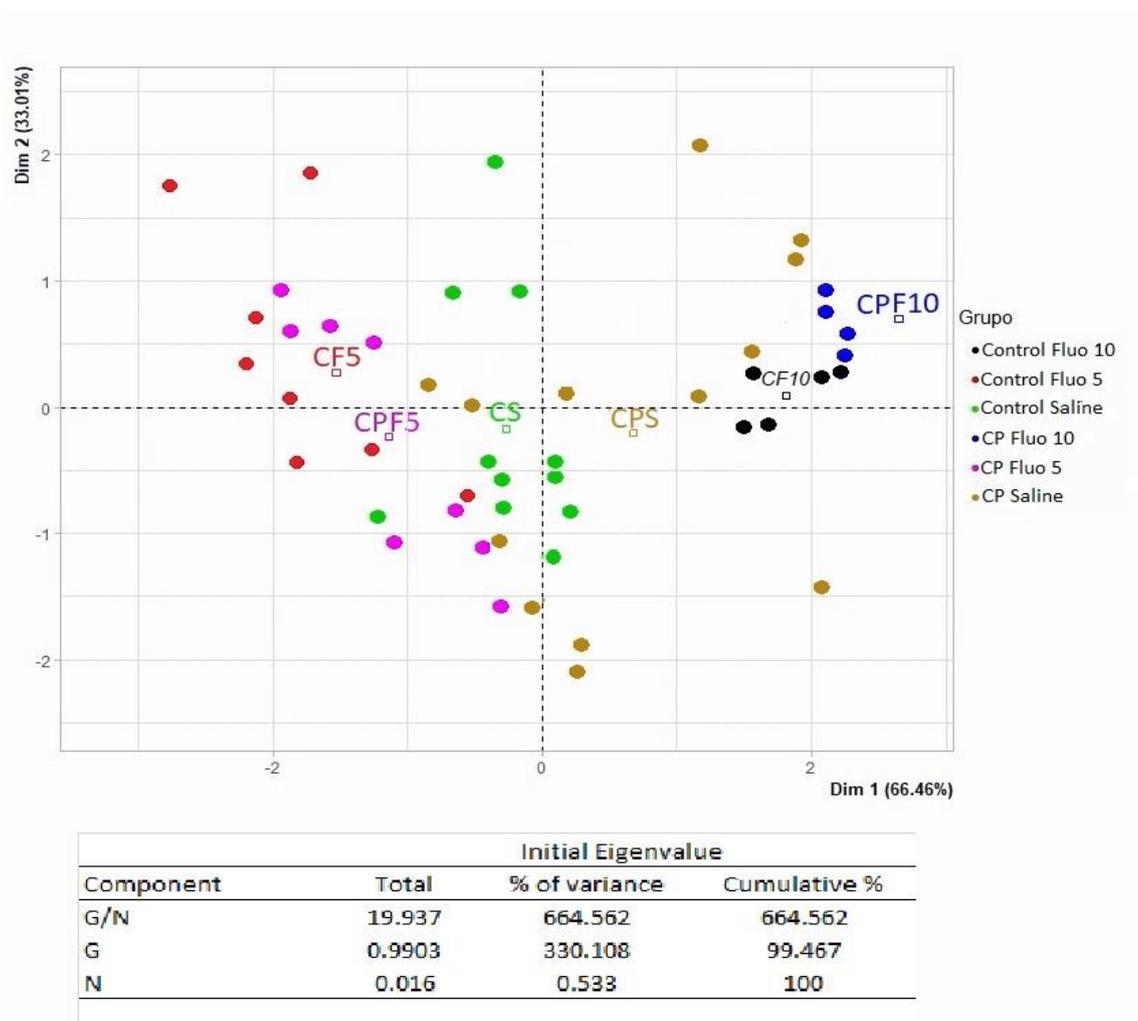


Figure 4. PCA analysis on the number of neurons, number of glial cells, glia / neuron index on the 29th day of postnatal life. Groups: CS (n = 19), CF10 (n = 16), CF5 (n = 19), CPS (n = 19), CPF10 (n = 16) and CPF5 (n = 18).

The number of neurons increased in the CF5 group compared to the CF10 group (2740.5 ± 177.3 vs. 1980.4 ± 28.8 ; $P = 0.008$) and compared to the Control Saline group ($2216.6 \pm 121, 5$, $P < 0.05$). However, no significant difference was observed when comparing the animals subjected to CP (Tukey's post hoc test: P : N.S; figure 5). These data suggest that low dose fluoxetine stimulates neurogenesis and neuroplasticity in the S1, but not specific impact of CP.

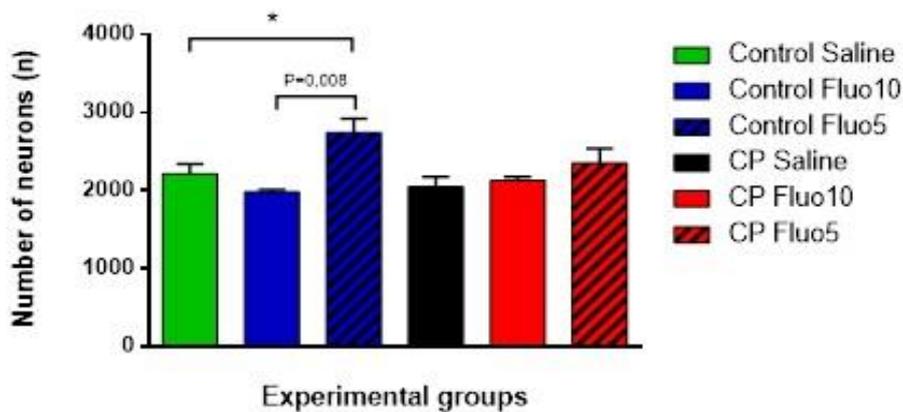


Figure 5. Number of neurons per unit area in the experimental groups CS (n = 11), CF10 (n = 5), CF5 (n = 8), CPS (n = 13), CPF10 (n = 4), CPF5 (n = 8). The number of neurons increased in the Control Fluo5 group compared to the other Control groups. Data are expressed as mean and SEM. * $P < 0.05$.

The number of glial cells increased significantly in the Control Fluo10 group compared to the Control Saline group (4312 ± 120.8 vs. 3034.6 ± 162.9 ; $P = 0.003$) and Control Fluo5 (2361.625 ± 131.1 ; $P < 0.001$). The number of glial cells increased in CP Fluo 10 group when compared to CP Saline (3544.6 ± 303.5 ; $P = 0.004$) and CP Fluo5 ($2459, 7 \pm 71.5$; $P < 0.001$). Conversely, CP Fluo5 group showed a lower number of glial cells compared to the CP Saline group (Tukey's post hoc test: $P = 0.002$; Figure 6). These results suggest that the increase in the number of glial cells by treatment with fluoxetine (10mg/kg) resulted from reactive astrogliosis, which may be associated with neuroinflammation, and low doses of fluoxetine (5mg/kg)

attenuated

such

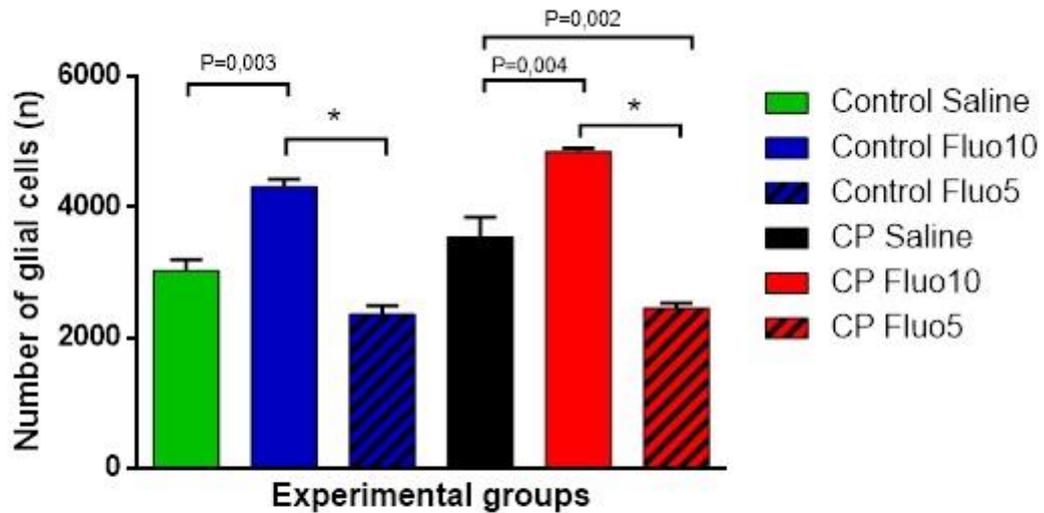


Figure 6. Number of glial cells per unit area in the experimental groups CS (n = 11), CF10 (n = 5), CF5 (n = 8), CPS (n = 13), CPF10 (n = 4), CPF5 (n = 8). The number of glial cells increased in the Control Fluo10 and CP Fluo10 groups compared to their respective control groups. Data are expressed as mean and SEM. * P <0.001.

effect.

The glial / neuron index was calculated by the quotient between number of glial cells and number of neurons. The CPS group (1.73 ± 0.11), when compared to CS (1.38 ± 0.05) demonstrated to increase the glia / neuron index, showing the influence of CP on this parameter (Tukey's post hoc test: $P < 0.001$). Beyond that, high doses of fluoxetine CF10 (2.18 ± 0.06) increased glial / neuron index compared to Control Saline or Control Fluo5 (0.88 ± 0.07) (Tukey's post hoc test: $P < 0.001$). Similarly, CP Fluo 10 (2.28 ± 0.03) increased glial / neuron index when compared with CP Salina or CP Fluo5 (1.08 ± 0.07) (Tukey's post hoc test: $P < 0.001$). These results suggest that low-dose fluoxetine (5mg/kg) induced protective response, by reduction of glial / neuron index in S1.

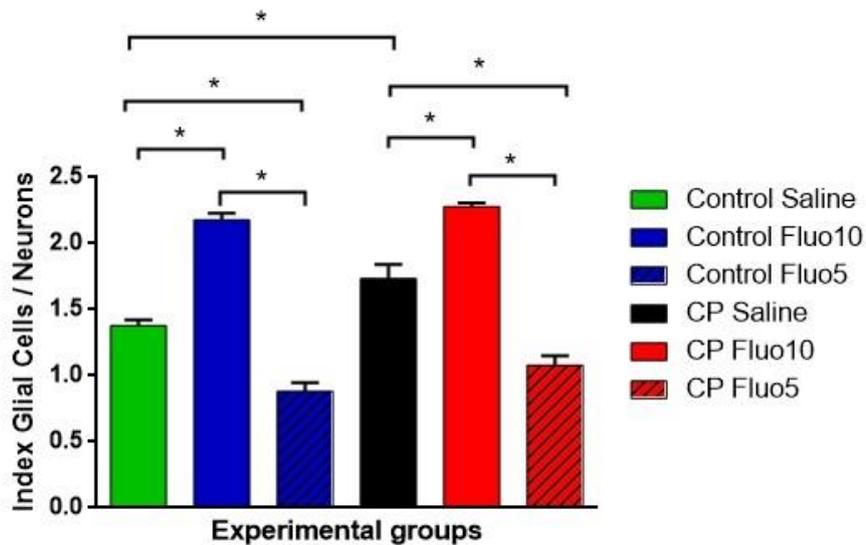


Figure 7. The glial / neuron index of experimental groups CS (n = 11), CF10 (n = 5), CF5 (n = 8), CPS (n = 13), CPF10 (n = 4), CPF5 (n = 8). Data are expressed as mean and SEM. * P < 0.001.

Discussion

We analyzed the effects of experimental CP on body weight and histomorphometric analysis of S1. In addition, this study was the first to evaluate the therapeutic potential of fluoxetine in minimizing S1 impairments in our rat model of CP. Our main findings show that experimental CP leads to the following: (1) limited body weight; (2) and increased glial / neuron index. Regarding the data obtained from animals treated with fluoxetine, we found that (1) high dose (10mg/kg) limited body weight; (2) low dose (5mg / kg) did not affect body weight; (3) high dose (10mg/kg) increased number of glial cells and glial / neuron index; (4) and low dose (5mg / kg) increased number of neurons, reduced glial cells and glial / neuron index. Regarding the data obtained from animals subjected to CP and treated with fluoxetine, we found that (1) high dose (10mg/kg) limited body weight; (2) increased number of glial cells and glial / neuron index; (2) and low dose (5mg / kg) attenuated such effects. These findings demonstrated that pharmacological manipulation of 5-HT by low dose of fluoxetine (5mg / kg) administration may contribute to reducing S1 injuries in rats with experimental CP.

Body weight

CP limited the body weight gain during the lactation period. Previous studies showed that the CP model used impaired somatic growth and body weight gain

(MARCUIZZO et al., 2010b; SILVA et al., 2016). Structural changes in the musculoskeletal system, such as muscle atrophy and low bone density resulting from sensorimotor restriction, have shown to influence body weight gain during somatic development (BURATTI et al., 2019; DELCOUR et al., 2018). These changes affect functional aspects of motor performance, with a decrease in motor coordination and muscle strength of animals subjected to HI with hindpaws restriction (AHMED et al., 2017; KIM et al., 2017a; STIGGER et al., 2011). In addition, Silva et al (2016) found that low body weight in animals subjected to CP promotes changes in patterns of locomotor activity, such as reduced mean power and kinetic energy. Concomitant to these changes in locomotor activity, the extensor and plantar flexion pattern observed in spastic diplegic children has also been observed our model of CP (DELCOUR et al., 2018). These animals tend to move in a digitigrade pattern due to spasticity caused by muscle hyperreflexia (DELCOUR et al., 2018). In consequence of disorder in motor activities, we suggest that induction of CP may increase energy expenditure due to difficult to locomotion, similarly of children with CP. Thus, the atypical gait pattern decreases the proprioceptive feedback in the hindpaws that leads to immature sensorimotor circuits of the M1 and S1, which leads to functional desorganization of the S1 and M1 maps (COQ et al., 2008; DELCOUR et al., 2018). Thus, we suggest that peripheral changes intensified central damage in the S1 and M1 cortex, and also the opposite occurred, which may perpetuate a viscous cycle.

Changes in the control of orofacial muscles in animals subjected to CP models also contribute to suction and swallowing deficits, reducing food intake and leading to a low nutritional status. (LACERDA et al., 2017a). The incoordination of sucking and swallowing results from nasal regurgitation or inability to retain milk and delay or absence of head mobility when stimulated (LACERDA et al., 2017a). Other motor and sensory parameters were also found, such as difficulties in obtaining reach and acquire food and hyposensitivity to smell, also being involved in reduction of food consumption (LACERDA et al., 2017a). Therefore, we suggest that induction of CP promote a great impact on the energy balance variables, characterized by the possible increase in energy expenditure associated with the decline in food consumption, and in consequence limited body weight.

The use of fluoxetine in high dosage (10mg / kg), associated or not with CP, limited the body weight gain when compared to the CPS, CPF5 and CS groups.

However, the administration of low dosage (5mg / kg) did not interfere with body weight, suggesting maintenance of the integrity of physical and somatic development. Corroborating the results of our study, the use of SSRI in high dosage (above 10mg / kg) demonstrated a great impact on the body weight of newborn rats (DA SILVA et al., 2015; DEIRÓ et al., 2004, 2006; PINHEIRO et al., 2019). Thus, the increase in 5-HT availability in the synaptic cleft is associated with greater satiety and increased anorexic expression since the first week of life in rats treated with high SSRI doses (DEIRÓ et al., 2008, 2004, 2006). In addition, previous studies found that the use of Citalopram or Fluoxetine in low dosage (5mg / kg) in neonatal rats did not show any significant difference compared to their control groups, similar of our findings (DEIRÓ et al., 2004, 2006). Furthermore, supplementation with tryptophan (50mg), a precursor to 5-HT, also showed no difference in body weight of animals subjected to the same model of CP (LACERDA et al., 2019).

Thus, the effect of high-dose fluoxetine on the regulation of hunger and satiety is associated with the activity of the serotonergic system in the arcuate nucleus of the hypothalamus, the main regulator of eating behavior (DA L.D. BARROS et al., 2018). The arcuate nucleus consists of neurons that express orexigenic neuropeptides (NPY and AgRP) and anorectic (POMC and CART) that are involved in the regulation of hunger and satiety (DA L.D. BARROS et al., 2018). Previous studies have shown that the use of SSRIs reduces food intake in animals due to the inhibitory action of 5-HT on satiety (DEIRÓ et al., 2006; ISHII et al., 2003; PINHEIRO et al., 2019). Thus, through serotonergic receptors present in the arcuate nucleus, 5-HT acts by increasing POMC synthesis through the 5HT_{2C} receptor and inhibiting the action of NPY / AgRP through the 5HT_{1B} receptor, reducing food intake (DA L.D. BARROS et al., 2018).

Besides that, the administration of a 5HT₂ antagonist drug (Methysergide) or a 5HT₂ agonist (quipazine) in a single dose of 10mg inhibits the sucking behavior of rats during the lactation period (NOCK; WILLIAMS; HALL, 1978). Furthermore, the use of a high dose of fluoxetine in a single dose, led to deficit in coordination of jaw movements during chewing, which impaired the formation of proper feed bolus to deglutition. (CREED et al., 2012). However, the use of quipazine (5mg) or tryptophan (20mg) facilitated the deglutition reflex of rats (BIEGER, 1981). Therefore, these data corroborate our findings, demonstrating that manipulations of the serotonergic

system through the use of low dose fluoxetine (5mg / kg) protects the somatic development of animals by maintaining food consumption through maturation of orofacial functions, including sucking, chewing and deglutition.

Primary Somatosensory Cortex (S1)

The CP model used in our study showed no difference in the number of neurons, however increased glial / neuron index. Our data corroborate with previous studies that analyzed the effect of CP based on sensorimotor restriction on S1, with no differences in the number of neurons (DOS SANTOS et al., 2017; MARCUZZO et al., 2010a). Such findings may be associated with the barrier effect resulting from the glial scar, also known as astrogliosis, formed by the increase in the number and size of astrocytes after hypoxic-ischemic insult (MARCUIZZO et al., 2010a). This phenomenon causes endogenous neurogenesis to be preserved after insult, although ischemia still causes less cell production and death, affecting the normal plasticity of development that occurs in the brain still immature (ROCHA-FERREIRA; HRISTOVA, 2016). The increase in the number of glial cells observed in CP may be related to the anoxic insult that stimulates neuroinflammation. Several models of CP have shown changes in the nervous system, such as early activation of microglia and oligodendrocytes, resulting in hypomyelination and neuronal loss of noble areas, including S1 (LACERDA et al., 2017a; ROCHA-FERREIRA; HRISTOVA, 2016). In addition, astrocyte hypertrophy occurs in several brain areas, triggering a hyper-reactivity and decreasing the supply of oxygen and glucose in the neural tissue (LACERDA et al., 2017a; MUCCI et al., 2017). Besides, HI causes a decrease in neurotransmission, cell signaling, neural connectivity and function due to the loss of neural cells during a hypoxic-ischemic episode and also due to impaired expression of growth and differentiation factors (ROCHA-FERREIRA; HRISTOVA, 2016).

The use of high doses of fluoxetine showed low neurogenic activity in the CF10 group. However, the number of neurons increased in the CF5 group compared to control groups, indicating that the low dosage of fluoxetine stimulates neurogenesis. Corroborating our results, the use of high doses of fluoxetine demonstrated an adverse effect on neurogenesis, with a consequent exacerbation of functional deficits in hypoxic-ischemic animals (CHANG et al., 2006). Furthermore, there is evidence that demonstrates that the use of high doses of fluoxetine results in neurobehavioral consequences, such as increased emotional reactivity and changes

in the motivational system, and reduced body weight (CAGIANO et al., 2008b). However, according to Chang et al (2006), lower doses (<5mg / kg) tend to induce neurogenesis and neuroplasticity in hypoxic-ischemic rats (CHANG et al., 2006). Such a neuroprotective mechanism has been associated with increased production of vascular endothelial growth factor, increased phosphorylation of the binding protein to the cAMP response element (CREB) and increased neurogenesis (CHANG et al., 2006). It was also seen that the use of low doses in early in life did not produce long-term adverse effects on cognition or behavior (CHANG et al., 2006).

Many studies corroborate the protective and anti-inflammatory effect of fluoxetine, which acts by decreasing excitotoxicity and inflammation, and also stimulate neurogenesis (MCCANN et al., 2014; PARIENTE J, LOUBINOX I, CAREL C, ALBUCHER JF, LEGER A, MANELFE C, RASCOL O, 2001). Fluoxetine has been shown to produce of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which plays an important role in the survival, remodeling and differentiation of neurons and vascular endothelial growth factor (HE et al., 2016). Thus, fluoxetine acts by decreasing neuronal damage and oxidative stress, one of the first events of hypoxic-ischemic injury (HE et al., 2016). Along with that, the use of fluoxetine has an important role on angiogenesis, axonal and dendritic reorganization, important processes in the recovery of neural tissue after brain injuries (BENNINGHOFF et al., 2012; SUN et al., 2017).

It was observed in our study an increase in the number of glial cells and consequently in the glia-neuron index in the groups in which fluoxetine was administered in high dosage (CPF10 and CF10) compared to the other CP and control groups. Insults to the central nervous system, during early life, as occurs in CP, trigger early immune activation, which can lead to long-term neuronal and cognitive changes (TURANO; LAWRENCE; SCHWARZ, 2017). Faced with an ischemic episode, for example, glial cells are activated and trigger neuroinflammation in order to maintain the homeostasis and integrity of the neural tissue (YANG; ZHOU, 2019). Evidence suggests that glial cells act by changing their phenotype and function in the face of brain damage (LACERDA et al., 2017b; MUCCI et al., 2017). These findings corroborate previous studies that demonstrated an increase in the number of glial cells in rats subjected to a CP model with sensory motor restriction

(DOS SANTOS et al., 2017; MARCUZZO et al., 2010a). Other studies that administered lipopolysaccharide to pregnant rats showed an increase in the number of astrocytes in the brains of the young rats (KIM et al., 2014; ZHENGWEI CAI, ZHAO-LONG PAN, YI PANG, 2000). It is likely that this increase in glial cells occurred due to the occurrence of a reactive astrogliosis, a pathological process triggered by astrocytes after injury, which hypertrophy and form a glial scar (DOS SANTOS et al., 2017; MARCUZZO et al., 2010a; ROCHA-FERREIRA; HRISTOVA, 2016; YANG; ZHOU, 2019). In addition, deficits in myelination and reduction in axonal density exacerbate changes in the S1, resulting in sensorimotor functional deficits in hypoxic-ischemic animals (COQ et al., 2008; MARCUZZO et al., 2010a).

Additionally, neuroplasticity is seen as a particular quality of the brain as it brings beneficial effects through the growth of neural branches leading to a vast afforestation of dendrites and increased cognition (GIZA; PRINS, 2006). The developing brain is more plastic to external stimuli, however, regions of the brain that are still developing their fiber projections may be more vulnerable to abnormal neural connectivity due to injury or excessive excitatory circuits, resulting in functional deficits clinically relevant and disabling for the structures involved (GIZA; PRINS, 2006; GRAMSBERGEN, 2001; ROCHA-FERREIRA; HRISTOVA, 2016). Based on the Developmental Health and Disease Developmental Hypothesis (DOHaD) programming model, an evolutionary theory based on the adaptive response to the environment after an insult occurred during the sensitive period of uterine or early postnatal development (VAN DEN BERGH, 2011). we believe that the effect of manipulating serotonin with fluoxetine 5mg elicited a plastic adaptive response, predisposing S1 to short-term reconditioning.

Currently, the manipulation of serotonergic system, using SSRIs (CHOLLET et al., 2011; PARIENTE J, LOUBINOX I, CAREL C, ALBUCHER JF, LEGER A, MANELFE C, RASCOL O, 2001) increase the amount of 5-HT in the synaptic cleft, and seems to improving the motor function of individuals affected by stroke (BATSIKADZE et al., 2013b). Couple with findings obtained by clinical trials, experimental evidences revealed that SSRIs lead to improvement of neurobehavioral capacity in animal models of ischemic stroke (CHOLLET et al., 2011; MCCANN et al., 2014). Therefore, we suggest that it is possible that therapeutic strategies treatment with low dose of fluoxetine may induce positive repercussions on the

neuromotor system in animals subjected to CP. Therefore, the use of SSRIs, including fluoxetine, for the treatment of CP is a promising therapeutic strategy that demonstrates an important neuroprotective, anti-inflammatory and neuroregenerative role (MCCANN et al., 2014; SUN et al., 2017). However, it is crucial to investigate the effective dose to induce neuroprotection and minimizing CP impairments. According to our finding, treatment with low dose of fluoxetine (5mg/kg) improved histomorphometric parameters in rats subjected to experimental CP. Therefore, from these experimental data, we demonstrated the efficacy of therapy with low dose of fluoxetine to guarantee the appropriate development of S1 during the breast feeding period

Conclusion

The results found in the present study suggest that low dose fluoxetine has a low impact on the body weight of CP animals, stimulates the proliferation of neurons, developing a neuroprotective role on cerebral palsy and does not exacerbate the production of glial cells, and may play an anti-inflammatory role. However, the use of a high dose of fluoxetine, associated or not with CP, is likely to exacerbate neuroinflammation associated with an increase in the number of glial cells in S1. Our results suggest the therapeutic potential of low dose of fluoxetine on the S1 cortex of rats subjected to CP, by stimulating neurogenesis and neuroprotection in neonate rats.

References

- AHMED, J. et al. Lickometry: A novel and sensitive method for assessing functional deficits in rats after stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 37, n. 3, p. 755–761, 6 mar. 2017.
- ANDREW, M. J. et al. Optimising nutrition to improve growth and reduce neurodisabilities in neonates at risk of neurological impairment, and children with suspected or confirmed cerebral palsy. **BMC Pediatrics**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2015.
- ARAGÃO, R. DA S. et al. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents-A reproducibility study. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 216–221, 2011.
- ARTEAGA, O. et al. Pretreatment with resveratrol prevents neuronal injury and cognitive deficits induced by perinatal hypoxia-ischemia in rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–25, 2015.
- AZMITIA, E. C. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Research Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 413–424, 2001a.
- AZMITIA, E. C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain research bulletin**, v. 56, n. 5, p. 413–24, nov. 2001b.
- BATSIKADZE, G. et al. Effect of serotonin on paired associative stimulation-induced plasticity in the human motor cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 11, p. 2260–2267, 2013a.
- BATSIKADZE, G. et al. Effect of serotonin on paired associative stimulation-induced plasticity in the human motor cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 11, p. 2260–2267, 2013b.
- BENFER, K. A. et al. Longitudinal cohort protocol study of oropharyngeal dysphagia: Relationships to gross motor attainment, growth and nutritional status in preschool children with cerebral palsy. **BMJ Open**, v. 2, n. 4, 2012.
- BENNINGHOFF, J. et al. The complex role of the serotonin transporter in adult neurogenesis and neuroplasticity. A critical review. **World Journal of Biological**

Psychiatry, v. 13, n. 4, p. 240–247, 2012.

BIEGER, D. Role of bulbar serotonergic neurotransmission in the initiation of swallowing in the rat. **Neuropharmacology**, v. 20, n. 11, p. 1073–1083, 1981.

BLIZIOTES, M. Update in serotonin and bone. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 9, p. 4124–4132, 2010.

BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 6, p. 881–897, 2010.

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

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

BURATTI, P. et al. Morphofunctional characteristics of skeletal muscle in rats with cerebral palsy. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 100, n. 1, p. 49–59, 2019.

CAGIANO, R. et al. Neurofunctional effects in rats prenatally exposed to FLX. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 12, n. 3, p. 137–48, 2008a.

CAGIANO, R. et al. Neurofunctional effects in rats prenatally exposed to fluoxetine. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 3, p. 137–148, 2008b.

CANS, C.; DE-LA-CRUZ, J.; MERMET, M. A. **Epidemiology of cerebral palsy**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2008. v. 18

CHANG, H. H.; HAVTON, L. A. Serotonergic 5-HT_{1A} receptor agonist (8-OH-DPAT) ameliorates impaired micturition reflexes in a chronic ventral root avulsion model of incomplete cauda equina/conus medullaris injury. **Experimental Neurology**, v. 239, n. 1, p. 210–217, 2013.

- CHANG, Y. C. et al. Early-life fluoxetine exposure reduced functional deficits after hypoxic-ischemia brain injury in rat pups. **Neurobiology of Disease**, v. 24, n. 1, p. 101–113, 2006.
- CHEN, A. et al. Transplantation of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a model of perinatal brain injury. **Stem Cell Research**, v. 5, n. 3, p. 255–266, 2010.
- CHOLLET, F. et al. Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): A randomised placebo-controlled trial. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 2, p. 123–130, 2011.
- CHUA, C. O. et al. Consequences of Intraventricular Hemorrhage in a Rabbit Pup Model. **Stroke**, v. 40, n. 10, p. 3369–3377, out. 2009.
- COLVER, A.; FAIRHURST, C.; PHAROAH, P. O. D. Cerebral palsy. **The Lancet**, v. 383, n. 9924, p. 1240–1249, 2014.
- COQ, J. O. et al. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: Implications for cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p. 95–108, 2008.
- CREED, M. C. et al. Contribution of decreased serotonin release to the antidyskinetic effects of deep brain stimulation in a rodent model of tardive dyskinesia: Comparison of the subthalamic and entopeduncular nuclei. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 28, p. 9574–9581, 2012.
- DA L.D. BARROS, M. et al. Long term effects of neonatal exposure to fluoxetine on energy balance: A systematic review of experimental studies. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 298–306, 2018.
- DA SILVA, A. I. et al. Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in postnatal life. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 92, n. 4, p. 330–337, 2014.
- DA SILVA, A. I. et al. Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 47, n. 4, p. 309–318, 2015.
- DE FOUBERT, G. et al. Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-

derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. **Neuroscience**, v. 128, n. 3, p. 597–604, 2004.

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

DEIRÓ, T. C. B. J. et al. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1503–1509, 2004.

DEIRÓ, T. C. B. J. et al. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. **Physiology and Behavior**, v. 87, n. 2, p. 338–344, 2006.

DELCOUR, M. et al. Early movement restriction leads to enduring disorders in muscle and locomotion. **Brain Pathology**, v. 28, n. 6, p. 889–901, 2018.

DERRICK, M. et al. 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, 2004.

DI GIOVANNI, G. Serotonin in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. **Experimental Brain Research**, v. 230, n. 4, p. 371–373, 2013.

DIAZ HEIJTZ, R.; FORSSBERG, H. Translational studies exploring neuroplasticity associated with motor skill learning and the regulatory role of the dopamine system. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 57, n. s2, p. 10–14, 2015.

DILEK, M. et al. Protective effects of pentoxifylline on lipopolysaccharide-induced white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 26, n. 18, p. 1865–1871, 2013.

DOS SANTOS, A. S. et al. Characterization of a cerebral palsy-like model in rats: Analysis of gait pattern and of brain and spinal cord motor areas. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 60, n. April, p. 48–55, 2017.

ENCINAS, J. M.; VAAHTOKARI, A.; ENIKOLOPOV, G. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 21, p. 8233–8238, 2006.

- EYRE, J. A. Corticospinal tract development and its plasticity after perinatal injury. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 8, p. 1136–1149, 2007.
- FAN, H. C. et al. Current proceedings of cerebral palsy. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 3, p. 471–485, 2015.
- FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Animal Behaviour**, v. 13, n. 2–3, p. 234–IN5, 1965.
- GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 12, p. 1002–1012, dez. 2003.
- GELDENHUYS, W. J.; VAN DER SCHYF, C. J. The serotonin 5-HT 6 receptor: a viable drug target for treating cognitive deficits in Alzheimer's disease. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 9, n. 7, p. 1073–1085, 2009.
- GIZA, C. C.; PRINS, M. L. Is being plastic fantastic? Mechanisms of altered plasticity after developmental traumatic brain injury. **Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 4–5, p. 364–379, 2006.
- GOLDSTEIN, E. M. Spasticity management: An overview. **Journal of Child Neurology**, v. 16, n. 1, p. 16–23, 2001.
- GONZENBACH, R. R. et al. Fluoxetine and motor recovery after ischaemic stroke. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 6, p. 499–500, 2011.
- GRAHAM, H. K. et al. Cerebral palsy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 25, 2016.
- GRAMSBERGEN, A. Normal and abnormal development of motor behavior: lessons from experiments in rats. **Neural plasticity**, v. 8, n. 1–2, p. 17–29, 2001.
- HADDERS-ALGRA, M. Variation and Variability: Key Words in Human Motor Development. **Physical Therapy**, v. 90, n. 12, p. 1823–1837, 2010.
- HE, Y. T. et al. Effects of Fluoxetine on Neural Functional Prognosis after Ischemic Stroke: A Randomized Controlled Study in China. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 25, n. 4, p. 761–770, 2016.
- HERRERA-ANAYA, E. et al. Association between gross motor function and

nutritional status in children with cerebral palsy: a cross-sectional study from Colombia. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 58, n. 9, p. 936–941, 2016.

ISHII, Y. et al. Palatability, food intake and the behavioural satiety sequence in male rats. **Physiology and Behavior**, v. 80, n. 1, p. 37–47, 2003.

ISMAIL, F. Y.; FATEMI, A.; JOHNSTON, M. V. Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 21, n. 1, p. 23–48, 2017.

JOHARI, R. et al. Musculoskeletal Evaluation of Children with Cerebral Palsy. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 83, n. 11, p. 1280–1288, 2016.

KANNAN, S. et al. Decreased cortical serotonin in neonatal rabbits exposed to endotoxin in utero. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 31, n. 2, p. 738–749, 2011a.

KANNAN, S. et al. 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 fev. 2011b.

KARPOVA, N. N. et al. Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. **Science**, v. 334, n. 6063, p. 1731–1734, 2011.

KENT, R. M. **Cerebral palsy**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 110

KESAR, T. M. et al. Motor cortical functional geometry in cerebral palsy and its relationship to disability. **Clinical Neurophysiology**, v. 123, n. 7, p. 1383–1390, 2012.

KHODANOVICH, M. et al. Effects of fluoxetine on hippocampal neurogenesis and neuroprotection in the model of global cerebral ischemia in rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 12–24, 2018.

KIASATDOLATABADI, A. et al. The Role of Stem Cells in the Treatment of Cerebral Palsy: a Review. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 4963–4972, 2017.

KIM, H. N. et al. Comparative analysis of the beneficial effects of treadmill training and

electroacupuncture in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, n. 6, p. 1393–1402, 2017a.

KIM, K. et al. Effects of endurance exercise on expressions of glial fibrillary acidic protein and myelin basic protein in developing rats with maternal infection-induced cerebral palsy. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 10, n. 1, p. 9–14, 2014.

KIM, M. et al. Neurobehavioral Assessments in a Mouse Model of Neonatal Hypoxic-ischemic Brain Injury. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 129, p. 2–7, 2017b.

KOLB, B. et al. **Brain plasticity in the developing brain**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 207

KOLB, B.; HARKER, A.; GIBB, R. Principles of plasticity in the developing brain. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 59, n. 12, p. 1218–1223, 2017.

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

KUBERA, M. et al. Age-dependent stimulatory effect of desipramine and fluoxetine pretreatment on metastasis formation by B16F10 melanoma in male C57BL/6 mice. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 6, p. 1113–1126, 2009.

KURZ, M. J.; STUBERG, W. A.; DEJONG, S. L. Mechanical work performed by the legs of children with spastic diplegic cerebral palsy. **Gait and Posture**, v. 31, n. 3, p. 347–350, 2010.

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

LACERDA, D. C. et al. Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats. **Physiology and Behavior**, v. 173, p. 69–78, 2017b.

LACERDA, D. C. et al. Treatment with the essential amino acid L-tryptophan reduces masticatory impairments in experimental cerebral palsy. **Nutritional Neuroscience**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2019.

LEE, H.-T. et al. cAMP response element-binding protein activation in ligation

preconditioning in neonatal brain. **Annals of Neurology**, v. 56, n. 5, p. 611–623, 2004.

LESCH, K. P.; WAIDER, J. Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 175–191, 2012.

LI, W. L. et al. Chronic fluoxetine treatment improves ischemia-induced spatial cognitive deficits through increasing hippocampal neurogenesis after stroke. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 1, p. 112–122, 2009.

LIU, X. et al. Effects of fluoxetine on brain-derived neurotrophic factor serum concentration and cognition in patients with vascular dementia. **Clin Interv Aging**, v. 9, p. 411–418, 2014a.

LIU, X. et al. Biochemical and Biophysical Investigation of the Brain-derived Neurotrophic Factor Mimetic 7,8-Dihydroxyflavone in the Binding and Activation of the TrkB Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 40, p. 27571–27584, 3 out. 2014b.

MANCINI, M. C. et al. Comparison of functional activity performance in normally developing children and children with cerebral palsy. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 60, n. 2, p. 446–452, 2002.

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

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

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

MARQUES, M. R. et al. Beneficial effects of early environmental enrichment on motor development and spinal cord plasticity in a rat model of cerebral palsy. **Behavioural Brain Research**, v. 263, p. 149–157, 2014.

MARRET, S.; VANHULLE, C.; LAQUERRIERE, A. Pathophysiology of cerebral palsy. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 111, p. 169–176, 2013.

MATEOS, S. S. et al. Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 104, n. 1, p. 52–59, 2009.

MAZUR, M.; MILLER, R. H.; ROBINSON, S. Postnatal erythropoietin treatment mitigates neural cell loss after systemic prenatal hypoxic-ischemic injury. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 6, n. 3, p. 206–221, 2010.

MCCANN, S. K. et al. Efficacy of antidepressants in animal models of ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis. **Stroke**, v. 45, n. 10, p. 3055–3063, 2014.

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

MOHAMMAD-ZADEH, L. F., MOSES, L., GWALTNEY-BRANT, S. M. Serotonin : a review. n. 1957, p. 187–199, 2008.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 3, p. 471–483, 2002.

MUCCI, S. et al. Neuroprotection in Hypoxic-Ischemic Brain Injury Targeting Glial Cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 26, p. 3899–3906, 2017.

NOCK, B.; WILLIAMS, C. L.; HALL, W. G. Suckling behavior of the infant rat: Modulation by a developing neurotransmitter system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 8, n. 3, p. 277–280, 1978.

OSKOUI, M. et al. An update on the prevalence of cerebral palsy: A systematic review and meta-analysis. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 55, n. 6, p. 509–519, 2013.

PAKULA, A. T.; VAN NAARDEN BRAUN, K.; YEARGIN-ALLSOPP, M. Cerebral Palsy: Classification and Epidemiology. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 425–452, 2009.

PARIENTE J, LOUBINOX I, CAREL C, ALBUCHER JF, LEGER A, MANELFE C, RASCOL O, C. F. Fluoxetine modulates motor performance and cerebral activation of patients recovering from stroke. **Ann Neurol.**, v. 50, n. 6, p. 718–29, 2001.

PINHEIRO, I. L. et al. Neonatal fluoxetine exposure modulates serotonergic neurotransmission and disturb inhibitory action of serotonin on food intake. **Behavioural Brain Research**, v. 357–358, p. 65–70, 2019.

REINEBRANT, H. E.; WIXEY, J. A.; BULLER, K. 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, 2012.

RICHARDS, C. L.; MALOUIN, F. **Cerebral palsy: Definition, assessment and rehabilitation**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 111

ROCHA-FERREIRA, E.; HRISTOVA, M. Plasticity in the neonatal brain following hypoxic-ischaemic injury. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 16, 2016.

ROSENBAUM, P. et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy. **Developmental medicine and child neurology. Supplement**, v. 109, n. April, p. 8–14, 2007.

SAADANI-MAKKI, F. et al. Intrauterine administration of endotoxin leads to motor deficits in a rabbit model: a link between prenatal infection and cerebral palsy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 199, n. 6, p. 651.e1-651.e7, 2008.

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

SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. VI. relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research**, v. 33, n. 2, p. 303–314, 1971.

STIGGER, F. et al. Effects of fetal exposure to lipopolysaccharide, perinatal anoxia and sensorimotor restriction on motor skills and musculoskeletal tissue: Implications for an animal model of cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 228, n. 2, p.

183–191, 2011.

STRATA, F. et al. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: Implications for a rodent model of cerebral palsy. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 141–156, 2004.

SUN, X. et al. Fluoxetine enhanced neurogenesis is not translated to functional outcome in stroke rats. **Neuroscience Letters**, v. 603, p. 31–36, 2015.

SUN, Y. et al. Neuroplasticity and behavioral effects of fluoxetine after experimental stroke. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 35, n. 5, p. 457–468, 2017.

TSUJI, M. et al. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34+cells in a mouse model of neonatal stroke. **Neuroscience**, v. 263, p. 148–158, 2014.

TURANO, A.; LAWRENCE, J. H.; SCHWARZ, J. M. Activation of neonatal microglia can be influenced by other neural cells. **Neuroscience Letters**, v. 657, p. 32–37, 2017.

VAN DEN BERGH, B. R. H. Developmental programming of early brain and behaviour development and mental health: a conceptual framework. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 53, n. SUPPL.4, p. 19–23, 2011.

VAN LIESHOUT, P. et al. Onset factors in cerebral palsy: A systematic review. **NeuroToxicology**, v. 61, p. 47–53, 2017.

VITRIKAS, K.; DALTON, H.; BREISH, D. Cerebral palsy: An overview. **American Family Physician**, v. 101, n. 4, p. 213–220, 2020.

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

WILLIAMS, M. et al. Maternal Inflammation Results in Altered Tryptophan Metabolism in Rabbit Placenta and Fetal Brain. **Developmental Neuroscience**, v. 39, n. 5, p. 399–412, 2017a.

WILLIAMS, M. et al. Maternal Inflammation Results in Altered Tryptophan Metabolism in Rabbit Placenta and Fetal Brain. **Developmental Neuroscience**, v.

39, n. 5, p. 399–412, 2017b.

WIMALASUNDERA, N.; STEVENSON, V. L. Cerebral palsy. **Practical Neurology**, v. 16, n. 3, p. 184–194, 2016.

YANG, Q. QIAO; ZHOU, J. WEI. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. **Glia**, v. 67, n. 6, p. 1017–1035, 2019.

ZAGHLOUL, N.; PATEL, H.; AHMED, M. N. A model of Periventricular Leukomalacia (PVL) in neonate mice with histopathological and neurodevelopmental outcomes mimicking human PVL in neonates. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175438, 13 abr. 2017.

ZHANG, Z. et al. Traumatic Injury Leads to Inflammation and Altered Tryptophan Metabolism in the Juvenile Rabbit Brain. **Journal of Neurotrauma**, v. 36, n. 1, p. 74–86, 2019.

ZHENGWEI CAI, ZHAO-LONG PAN, YI PANG, O. B. E. & P. G. R. Cytokine Induction in Fetal Rat Brains and Brain Injury in Neonatal Rats After Maternal Lipopolysaccharide Administration. **Pediatric Research**, v. 47, n. 64, p. 1, 2000.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo avaliou os efeitos da fluoxetina em baixa dosagem sobre as funções motoras e sobre parâmetros histomorfométricos do córtex somatossensorial de ratos submetidos a paralisia cerebral no período neonatal. Nossos achados vão contra nossa hipótese inicialmente apresentada para as avaliações somáticas, reflexas, de locomoção e de equilíbrio nos grupos que sofreram paralisia cerebral. No entanto, na análise do córtex somatossensorial, o uso de fluoxetina em alta dosagem demonstrou efeito neuroinflamatório, enquanto que a fluoxetina em baixa dosagem demonstra papel neurogênico e neuroprotetor sobre o córtex somatossensorial. Assim, com base nesses achados, nosso estudo pode auxiliar no desenvolvimento de estratégia terapêutica, uma vez que a fluoxetina em baixa dosagem estimula a neurogênese e diminui a neuroinflamação em ratos que sofreram anóxia e restrição sensório-motora. Assim, é possível que outros parâmetros não avaliados nesse estudo, mas que envolvam a análise da cognição, comportamento e memória, possam se beneficiar da administração de fluoxetina em baixa dosagem. Além disso, alterações no córtex somatossensorial podem repercutir no sistema motor devido a associação com o córtex motor primário. Dessa forma, nosso estudo deve ser considerado para uma melhor avaliação da repercussão da baixa dosagem de fluoxetina sobre o desenvolvimento neuromotor de ratos submetidos a paralisia cerebral experimental.

REFERÊNCIAS

- AHMED, J. et al. Lickometry: A novel and sensitive method for assessing functional deficits in rats after stroke. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 37, n. 3, p. 755–761, 6 mar. 2017.
- ANDREW, M. J. et al. Optimising nutrition to improve growth and reduce neurodisabilities in neonates at risk of neurological impairment, and children with suspected or confirmed cerebral palsy. **BMC Pediatrics**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2015.
- ARAGÃO, R. DA S. et al. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents-A reproducibility study. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 195, n. 2, p. 216–221, 2011.
- ARTEAGA, O. et al. Pretreatment with resveratrol prevents neuronal injury and cognitive deficits induced by perinatal hypoxia-ischemia in rats. **PLoS ONE**, v. 10, n. 11, p. 1–25, 2015.
- AZMITIA, E. C. Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Research Bulletin**, v. 56, n. 5, p. 413–424, 2001a.
- AZMITIA, E. C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain research bulletin**, v. 56, n. 5, p. 413–24, nov. 2001b.
- BATSIKADZE, G. et al. Effect of serotonin on paired associative stimulation-induced plasticity in the human motor cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 11, p. 2260–2267, 2013a.
- BATSIKADZE, G. et al. Effect of serotonin on paired associative stimulation-induced plasticity in the human motor cortex. **Neuropsychopharmacology**, v. 38, n. 11, p. 2260–2267, 2013b.
- BENFER, K. A. et al. Longitudinal cohort protocol study of oropharyngeal dysphagia: Relationships to gross motor attainment, growth and nutritional status in preschool children with cerebral palsy. **BMJ Open**, v. 2, n. 4, 2012.
- BENNINGHOFF, J. et al. The complex role of the serotonin transporter in adult neurogenesis and neuroplasticity. A critical review. **World Journal of Biological Psychiatry**, v. 13, n. 4, p. 240–247, 2012.
- BIEGER, D. Role of bulbar serotonergic neurotransmission in the initiation of swallowing in the rat. **Neuropharmacology**, v. 20, n. 11, p. 1073–1083, 1981.
- BLIZIOTES, M. Update in serotonin and bone. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95, n. 9, p. 4124–4132, 2010.
- BOKSA, P. Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 24, n. 6, p. 881–897, 2010.
- BUDHDEO, S.; RAJAPAKSA, S. Functional recovery in cerebral palsy may be potentiated by administration of selective serotonin reuptake inhibitors. **Medical Hypotheses**, v. 77, n. 3, p. 386–388, set. 2011.

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

BURATTI, P. et al. Morphofunctional characteristics of skeletal muscle in rats with cerebral palsy. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 100, n. 1, p. 49–59, 2019.

CAGIANO, R. et al. Neurofunctional effects in rats prenatally exposed to FLX. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 12, n. 3, p. 137–48, 2008a.

CAGIANO, R. et al. Neurofunctional effects in rats prenatally exposed to fluoxetine. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 12, n. 3, p. 137–148, 2008b.

CANS, C.; DE-LA-CRUZ, J.; MERMET, M. A. **Epidemiology of cerebral palsy**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2008. v. 18

CHANG, H. H.; HAVTON, L. A. Serotonergic 5-HT_{1A} receptor agonist (8-OH-DPAT) ameliorates impaired micturition reflexes in a chronic ventral root avulsion model of incomplete cauda equina/conus medullaris injury. **Experimental Neurology**, v. 239, n. 1, p. 210–217, 2013.

CHANG, Y. C. et al. Early-life fluoxetine exposure reduced functional deficits after hypoxic-ischemia brain injury in rat pups. **Neurobiology of Disease**, v. 24, n. 1, p. 101–113, 2006.

CHEN, A. et al. Transplantation of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a model of perinatal brain injury. **Stem Cell Research**, v. 5, n. 3, p. 255–266, 2010.

CHOLLET, F. et al. Fluoxetine for motor recovery after acute ischaemic stroke (FLAME): A randomised placebo-controlled trial. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 2, p. 123–130, 2011.

CHUA, C. O. et al. Consequences of Intraventricular Hemorrhage in a Rabbit Pup Model. **Stroke**, v. 40, n. 10, p. 3369–3377, out. 2009.

COLVER, A.; FAIRHURST, C.; PHAROAH, P. O. D. Cerebral palsy. **The Lancet**, v. 383, n. 9924, p. 1240–1249, 2014.

COQ, J. O. et al. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: Implications for cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p. 95–108, 2008.

CREED, M. C. et al. Contribution of decreased serotonin release to the antidyskinetic effects of deep brain stimulation in a rodent model of tardive dyskinesia: Comparison of the subthalamic and entopeduncular nuclei. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 28, p. 9574–9581, 2012.

DA L.D. BARROS, M. et al. Long term effects of neonatal exposure to fluoxetine on energy balance: A systematic review of experimental studies. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, p. 298–306, 2018.

DA SILVA, A. I. et al. Fluoxetine treatment of rat neonates significantly reduces oxidative stress in the hippocampus and in behavioral indicators of anxiety later in

postnatal life. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 92, n. 4, p. 330–337, 2014.

DA SILVA, A. I. et al. Fluoxetine induces lean phenotype in rat by increasing the brown/white adipose tissue ratio and UCP1 expression. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 47, n. 4, p. 309–318, 2015.

DE FOUBERT, G. et al. Fluoxetine-induced change in rat brain expression of brain-derived neurotrophic factor varies depending on length of treatment. **Neuroscience**, v. 128, n. 3, p. 597–604, 2004.

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

DEIRÓ, T. C. B. J. et al. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 10, p. 1503–1509, 2004.

DEIRÓ, T. C. B. J. et al. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. **Physiology and Behavior**, v. 87, n. 2, p. 338–344, 2006.

DELCOUR, M. et al. Early movement restriction leads to enduring disorders in muscle and locomotion. **Brain Pathology**, v. 28, n. 6, p. 889–901, 2018.

DERRICK, M. et al. 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, 2004.

DI GIOVANNI, G. Serotonin in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. **Experimental Brain Research**, v. 230, n. 4, p. 371–373, 2013.

DIAZ HEIJTZ, R.; FORSSBERG, H. Translational studies exploring neuroplasticity associated with motor skill learning and the regulatory role of the dopamine system. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 57, n. s2, p. 10–14, 2015.

DILEK, M. et al. Protective effects of pentoxifylline on lipopolysaccharide-induced white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 26, n. 18, p. 1865–1871, 2013.

DOS SANTOS, A. S. et al. Characterization of a cerebral palsy-like model in rats: Analysis of gait pattern and of brain and spinal cord motor areas. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 60, n. April, p. 48–55, 2017.

ENCINAS, J. M.; VAAHTOKARI, A.; ENIKOLOPOV, G. Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 21, p. 8233–8238, 2006.

EYRE, J. A. Corticospinal tract development and its plasticity after perinatal injury. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 8, p. 1136–1149, 2007.

FAN, H. C. et al. Current proceedings of cerebral palsy. **Cell Transplantation**, v. 24, n. 3, p. 471–485, 2015.

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. **Animal Behaviour**, v. 13, n. 2–3, p. 234–IN5, 1965.

- GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 4, n. 12, p. 1002–1012, dez. 2003.
- GELDENHUYS, W. J.; VAN DER SCHYF, C. J. The serotonin 5-HT₆ receptor: a viable drug target for treating cognitive deficits in Alzheimer's disease. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 9, n. 7, p. 1073–1085, 2009.
- GIZA, C. C.; PRINS, M. L. Is being plastic fantastic? Mechanisms of altered plasticity after developmental traumatic brain injury. **Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 4–5, p. 364–379, 2006.
- GOLDSTEIN, E. M. Spasticity management: An overview. **Journal of Child Neurology**, v. 16, n. 1, p. 16–23, 2001.
- GONZENBACH, R. R. et al. Fluoxetine and motor recovery after ischaemic stroke. **The Lancet Neurology**, v. 10, n. 6, p. 499–500, 2011.
- GRAHAM, H. K. et al. Cerebral palsy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 25, 2016.
- GRAMSBERGEN, A. Normal and abnormal development of motor behavior: lessons from experiments in rats. **Neural plasticity**, v. 8, n. 1–2, p. 17–29, 2001.
- HADDERS-ALGRA, M. Variation and Variability: Key Words in Human Motor Development. **Physical Therapy**, v. 90, n. 12, p. 1823–1837, 2010.
- HE, Y. T. et al. Effects of Fluoxetine on Neural Functional Prognosis after Ischemic Stroke: A Randomized Controlled Study in China. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 25, n. 4, p. 761–770, 2016.
- HERRERA-ANAYA, E. et al. Association between gross motor function and nutritional status in children with cerebral palsy: a cross-sectional study from Colombia. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 58, n. 9, p. 936–941, 2016.
- HEYSER, C.J.,. Assessment of Developmental Milestones in Rodents. **Curr. Protoc. Neurosci.** 25, 1–15; 2003. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0818s25>
- ISHII, Y. et al. Palatability, food intake and the behavioural satiety sequence in male rats. **Physiology and Behavior**, v. 80, n. 1, p. 37–47, 2003.
- ISMAIL, F. Y.; FATEMI, A.; JOHNSTON, M. V. Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. **European Journal of Paediatric Neurology**, v. 21, n. 1, p. 23–48, 2017.
- JOHARI, R. et al. Musculoskeletal Evaluation of Children with Cerebral Palsy. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 83, n. 11, p. 1280–1288, 2016.
- KANNAN, S. et al. Decreased cortical serotonin in neonatal rabbits exposed to endotoxin in utero. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 31, n. 2, p. 738–749, 2011a.
- KANNAN, S. et al. 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 fev. 2011b.
- KARPOVA, N. N. et al. Fear erasure in mice requires synergy between

antidepressant drugs and extinction training. **Science**, v. 334, n. 6063, p. 1731–1734, 2011.

KENT, R. M. **Cerebral palsy**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 110

KESAR, T. M. et al. Motor cortical functional geometry in cerebral palsy and its relationship to disability. **Clinical Neurophysiology**, v. 123, n. 7, p. 1383–1390, 2012.

KHODANOVICH, M. et al. Effects of fluoxetine on hippocampal neurogenesis and neuroprotection in the model of global cerebral ischemia in rats. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 12–24, 2018.

KIASATDOLATABADI, A. et al. The Role of Stem Cells in the Treatment of Cerebral Palsy: a Review. **Molecular Neurobiology**, v. 54, n. 7, p. 4963–4972, 2017.

KIM, H. N. et al. Comparative analysis of the beneficial effects of treadmill training and electroacupuncture in a rat model of neonatal hypoxia-ischemia. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 39, n. 6, p. 1393–1402, 2017a.

KIM, K. et al. Effects of endurance exercise on expressions of glial fibrillary acidic protein and myelin basic protein in developing rats with maternal infection-induced cerebral palsy. **Journal of Exercise Rehabilitation**, v. 10, n. 1, p. 9–14, 2014.

KIM, M. et al. Neurobehavioral Assessments in a Mouse Model of Neonatal Hypoxic-ischemic Brain Injury. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 129, p. 2–7, 2017b.

KOLB, B. et al. **Brain plasticity in the developing brain**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 207

KOLB, B.; HARKER, A.; GIBB, R. Principles of plasticity in the developing brain. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 59, n. 12, p. 1218–1223, 2017.

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

KUBERA, M. et al. Age-dependent stimulatory effect of desipramine and fluoxetine pretreatment on metastasis formation by B16F10 melanoma in male C57BL/6 mice. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 6, p. 1113–1126, 2009.

KURZ, M. J.; STUBERG, W. A.; DEJONG, S. L. Mechanical work performed by the legs of children with spastic diplegic cerebral palsy. **Gait and Posture**, v. 31, n. 3, p. 347–350, 2010.

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

LACERDA, D. C. et al. Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats. **Physiology and Behavior**, v. 173, p. 69–78, 2017b.

LACERDA, D. C. et al. Treatment with the essential amino acid L-tryptophan reduces masticatory impairments in experimental cerebral palsy. **Nutritional Neuroscience**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2019.

LEE, H.-T. et al. cAMP response element-binding protein activation in ligation

preconditioning in neonatal brain. **Annals of Neurology**, v. 56, n. 5, p. 611–623, 2004.

LESCH, K. P.; WAIDER, J. Serotonin in the Modulation of Neural Plasticity and Networks: Implications for Neurodevelopmental Disorders. **Neuron**, v. 76, n. 1, p. 175–191, 2012.

LI, W. L. et al. Chronic fluoxetine treatment improves ischemia-induced spatial cognitive deficits through increasing hippocampal neurogenesis after stroke. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 1, p. 112–122, 2009.

LIU, X. et al. Effects of fluoxetine on brain-derived neurotrophic factor serum concentration and cognition in patients with vascular dementia. **Clin Interv Aging**, v. 9, p. 411–418, 2014a.

LIU, X. et al. Biochemical and Biophysical Investigation of the Brain-derived Neurotrophic Factor Mimetic 7,8-Dihydroxyflavone in the Binding and Activation of the TrkB Receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 40, p. 27571–27584, 3 out. 2014b.

MANCINI, M. C. et al. Comparison of functional activity performance in normally developing children and children with cerebral palsy. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 60, n. 2, p. 446–452, 2002.

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

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

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

MARQUES, M. R. et al. Beneficial effects of early environmental enrichment on motor development and spinal cord plasticity in a rat model of cerebral palsy. **Behavioural Brain Research**, v. 263, p. 149–157, 2014.

MARRET, S.; VANHULLE, C.; LAQUERRIERE, A. Pathophysiology of cerebral palsy. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 111, p. 169–176, 2013.

MATEOS, S. S. et al. Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 104, n. 1, p. 52–59, 2009.

MAZUR, M.; MILLER, R. H.; ROBINSON, S. Postnatal erythropoietin treatment mitigates neural cell loss after systemic prenatal hypoxic-ischemic injury. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 6, n. 3, p. 206–221, 2010.

MCCANN, S. K. et al. Efficacy of antidepressants in animal models of ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis. **Stroke**, v. 45, n. 10, p. 3055–3063, 2014.

MCINTYRE, S. et al. A systematic review of risk factors for cerebral palsy in children

- born at term in developed countries. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 55, n. 6, p. 499–508, 2013.
- MOHAMMAD-ZADEH, L. F., MOSES, L., GWALTNEY-BRANT, S. M. Serotonin : a review. n. 1957, p. 187–199, 2008.
- MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 3, p. 471–483, 2002.
- MUCCI, S. et al. Neuroprotection in Hypoxic-Ischemic Brain Injury Targeting Glial Cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 26, p. 3899–3906, 2017
- NGUYEN, A.T., Armstrong, E.A., Yager, J.Y. Neurodevelopmental reflex testing in neonatal rat pups. **J. Vis. Exp.** 2017, 1–10; 2017. <https://doi.org/10.3791/55261>
- NOCK, B.; WILLIAMS, C. L.; HALL, W. G. Suckling behavior of the infant rat: Modulation by a developing neurotransmitter system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 8, n. 3, p. 277–280, 1978.
- OSKOUI, M. et al. An update on the prevalence of cerebral palsy: A systematic review and meta-analysis. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 55, n. 6, p. 509–519, 2013.
- PAKULA, A. T.; VAN NAARDEN BRAUN, K.; YEARGIN-ALLSOPP, M. Cerebral Palsy: Classification and Epidemiology. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 425–452, 2009.
- PARIENTE J, LOUBINOUX I, CAREL C, ALBUCHER JF, LEGER A, MANELFE C, RASCOL O, C. F. Fluoxetine modulates motor performance and cerebral activation of patients recovering from stroke. **Ann Neurol.**, v. 50, n. 6, p. 718–29, 2001.
- PINHEIRO, I. L. et al. Neonatal fluoxetine exposure modulates serotonergic neurotransmission and disturbs inhibitory action of serotonin on food intake. **Behavioural Brain Research**, v. 357–358, p. 65–70, 2019.
- REINEBRANT, H. E.; WIXEY, J. A.; BULLER, K. 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, 2012.
- RICHARDS, C. L.; MALOUIN, F. **Cerebral palsy: Definition, assessment and rehabilitation**. 1. ed. [s.l.] Elsevier B.V., 2013. v. 111
- ROCHA-FERREIRA, E.; HRISTOVA, M. Plasticity in the neonatal brain following hypoxic-ischaemic injury. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 16, 2016.
- ROSENBAUM, P. et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy. **Developmental medicine and child neurology. Supplement**, v. 109, n. April, p. 8–14, 2007.
- SAADANI-MAKKI, F. et al. Intrauterine administration of endotoxin leads to motor deficits in a rabbit model: a link between prenatal infection and cerebral palsy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 199, n. 6, p. 651.e1-651.e7, 2008.
- SILVA, K. O. G. DA et al. Effects of maternal low-protein diet on parameters of

locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 52, p. 38–45, 2016.

SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. VI. relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research**, v. 33, n. 2, p. 303–314, 1971.

STIGGER, F. et al. Effects of fetal exposure to lipopolysaccharide, perinatal anoxia and sensorimotor restriction on motor skills and musculoskeletal tissue: Implications for an animal model of cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 228, n. 2, p. 183–191, 2011.

STIGGER, F., et al. Inflammatory response and oxidative stress in developing rat brain and its consequences on motor behavior following maternal administration of LPS and perinatal anoxia. **Int. J. Dev. Neurosci.** 31, 820–827; 2013.

STRATA, F. et al. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: Implications for a rodent model of cerebral palsy. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 141–156, 2004.

SUN, X. et al. Fluoxetine enhanced neurogenesis is not translated to functional outcome in stroke rats. **Neuroscience Letters**, v. 603, p. 31–36, 2015.

SUN, Y. et al. Neuroplasticity and behavioral effects of fluoxetine after experimental stroke. **Restorative Neurology and Neuroscience**, v. 35, n. 5, p. 457–468, 2017.

TOSO, L., et al. Inflammatory-mediated model of cerebral palsy with developmental sequelae. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 193, 933–941; 2005.

TSUJI, M. et al. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34+cells in a mouse model of neonatal stroke. **Neuroscience**, v. 263, p. 148–158, 2014.

TURANO, A.; LAWRENCE, J. H.; SCHWARZ, J. M. Activation of neonatal microglia can be influenced by other neural cells. **Neuroscience Letters**, v. 657, p. 32–37, 2017.

VAN DEN BERGH, B. R. H. Developmental programming of early brain and behaviour development and mental health: a conceptual framework. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 53, n. SUPPL.4, p. 19–23, 2011.

VAN LIESHOUT, P. et al. Onset factors in cerebral palsy: A systematic review. **NeuroToxicology**, v. 61, p. 47–53, 2017.

VITRIKAS, K.; DALTON, H.; BREISH, D. Cerebral palsy: An overview. **American Family Physician**, v. 101, n. 4, p. 213–220, 2020.

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

WILLIAMS, M. et al. Maternal Inflammation Results in Altered Tryptophan Metabolism in Rabbit Placenta and Fetal Brain. **Developmental Neuroscience**, v. 39, n. 5, p. 399–412, 2017a.

WILLIAMS, M. et al. Maternal Inflammation Results in Altered Tryptophan Metabolism in Rabbit Placenta and Fetal Brain. **Developmental Neuroscience**, v.

39, n. 5, p. 399–412, 2017b.

WIMALASUNDERA, N.; STEVENSON, V. L. Cerebral palsy. **Practical Neurology**, v. 16, n. 3, p. 184–194, 2016.

YANG, Q. QIAO; ZHOU, J. WEI. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. **Glia**, v. 67, n. 6, p. 1017–1035, 2019.

ZAGHLOUL, N.; PATEL, H.; AHMED, M. N. A model of Periventricular Leukomalacia (PVL) in neonate mice with histopathological and neurodevelopmental outcomes mimicking human PVL in neonates. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175438, 13 abr. 2017.

ZHANG, Z. et al. Traumatic Injury Leads to Inflammation and Altered Tryptophan Metabolism in the Juvenile Rabbit Brain. **Journal of Neurotrauma**, v. 36, n. 1, p. 74–86, 2019.

ZHENGWEI CAI, ZHAO-LONG PAN, YI PANG, O. B. E. & P. G. R. Cytokine Induction in Fetal Rat Brains and Brain Injury in Neonatal Rats After Maternal Lipopolysaccharide Administration. **Pediatric Research**, v. 47, n. 64, p. 1, 2000.

APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF CHEMICAL NEUROANATOMY

> J Chem Neuroanat. 2020 Jan;103:101710. doi: 10.1016/j.jchemneu.2019.101710. Epub 2019 Nov 7.

Maternal exposure to busulfan reduces the cell number in the somatosensory cortex associated with delayed somatic and reflex maturation in neonatal rats

Henrique J C B Gouveia ¹, Raul Manhães-de-Castro ², Bárbara J R Costa-de-Santana ³, Carolina R Mendonça ¹, Gláyciele Albuquerque ⁴, Diego Bulcão Visco ¹, Diego Cabral Lacerda ¹, Ana Elisa Toscano ⁵

Affiliations + expand

PMID: 31706849 DOI: 10.1016/j.jchemneu.2019.101710

Abstract

Busulfan is a bifunctional alkylating agent used for myeloablative conditioning and in the treatment of chronic myeloid leukemia due to its ability to cause DNA damage. However, in rodent experiments, busulfan presented a potential teratogenic and cytotoxic effect. Studies have evaluated the effects of busulfan on fetuses after administration in pregnancy or directly on pups during the lactation period. There are no studies on the effects of busulfan administration during pregnancy on offspring development after birth. We investigated the effects of busulfan on somatic and reflex development and encephalic morphology in young rats after exposure in pregnancy. The pregnant rats were exposed to busulfan (10 mg/kg, intraperitoneal) during the early developmental stage (days 12-14 of the gestational period). After birth, we evaluated the somatic growth, maturation of physical features and reflex-ontogeny during the lactation period. We also assessed the effects of busulfan on encephalic weight and cortical morphometry at 28 days of postnatal life. As a result, busulfan-induced pathological changes included: microcephaly, evaluated by the reduction of cranial axes, delay in reflex maturation and physical features, as well as a decrease in the morphometric parameters of somatosensory and motor cortex. Thus, these results suggest that the administration of a DNA alkylating agent, such as busulfan, during the gestational period can cause damage to the central nervous system in the pups throughout their postnatal development.

Keywords: Alkylating agents; Brain development; Central nervous system; Microencephaly; Rats.

Copyright © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Gouveia, H.J.C.B., Manhães-de-Castro, R., Costa-de-Santana, B.J.R., Mendonça, C.R., Albuquerque, G., Visco, D.B., Lacerda, D.C., Toscano, A.E., 2020. Maternal exposure to busulfan reduces the cell number in the somatosensory cortex associated with delayed somatic and reflex maturation in neonatal rats. J. Chem. Neuroanat. 103, 101710. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.101710>

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-920 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 oma@ufpe.br

Recife, 29 de junho de 2018.

Ofício nº 50/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: Prof.^a Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro
 Centro Acadêmico de Vitória
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 0015/2018

Certificamos que a proposta intitulada "Paralisia cerebral experimental e manipulação serotoninérgica: Estudo da ontogênese de reflexos, atividade locomotora, coordenação motora e força muscular no período neonatal.", Registrada com o nº 0015/2018 sob a responsabilidade de Prof.^a Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 06/06/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	12 meses
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	105
Peso/idade	220-250g/ 90-120 dias
Sexo	Macho (75) e Fêmea (30)
Origem	Departamento de Nutrição - UFPE

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691