



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

**ESTUDO DO PADRÃO SENSORIO-MOTOR DA MASTIGAÇÃO:
IMPLICAÇÕES DA DESNUTRIÇÃO PERINATAL SOBRE A
PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

DIEGO CABRAL LACERDA

RECIFE

2016

DIEGO CABRAL LACERDA

**ESTUDO DO PADRÃO SENSÓRIO-MOTOR DA MASTIGAÇÃO:
IMPLICAÇÕES DA DESNUTRIÇÃO PERINATAL SOBRE A
PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre em Fisioterapia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Elisa Toscano Menezes da Silva Castro

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Kelli Nogueira Ferraz Pereira Althoff e Prof. Dr. Omar Guzman Quevedo

RECIFE

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária Gláucia Cândida da Silva, CRB4-1662

L131e Lacerda, Diego Cabral.
Estudo do padrão sensório-motor da mastigação: implicações da desnutrição perinatal sobre a paralisia cerebral experimental / Diego Cabral Lacerda. – 2016.
100 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Ana Elisa Toscano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Desnutrição Proteica. 2. Paralisia Cerebral. 3. Mastigação. 4. Ratos. I. Toscano, Ana Elisa. (Orientadora). II. Título.

615.8 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-205)

“ESTUDO DO PADRÃO SENSORIO-MOTOR DA MASTIGAÇÃO: IMPLICAÇÕES DA DESNUTRIÇÃO PERINATAL SOBRE A PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL”

DIEGO CABRAL LACERDA

APROVADO EM: 22/02/2016

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ANA ELISA TOSCANO MENESES DA SILVA CASTRO

COORIENTADORA: PROF^a. DR^a. KELLI NOGUEIRA FERRAZ PEREIRA ALTHOFF

COORIENTADOR: PROF^o. DR. OMAR GUZMÁN-QUEVED

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF^a. DR^a. KARLA MÔNICA FERRAZ TEIXEIRA LAMBERTZ – FISIOTERAPIA/UFPE

PROF. DR. RAUL MANHÃS DE CASTRO – NUTRIÇÃO/UFPE

PROF^a. DR^a. ALINE ISABEL DA SILVA – PNP/CAV/UFPE

Coordenadora do PPGFISIOTERAPIA/DEFISIO/UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA

Profa. Etiene Oliveira da Silva Fittipaldi

COORDENADOR DO MESTRADO EM FISIOTERAPIA

Profa. Daniella Araújo de Oliveira

VICE - COORDENADOR DO MESTRADO EM FISIOTERAPIA

Profa. Daniela Cunha Brandão

RECIFE

2016

Dedico este trabalho, primeiramente a Deus, por ter me abençoado sempre, e a meus pais por todo apoio e suporte durante esses anos. Em especial, agradeço a minha mãe, Ana Maria Cabral de Souza, batalhadora e guerreira, por sempre ter lutado por mim para que eu alcançasse meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço acima de tudo a **DEUS** por sempre está comigo me acompanhando e me dando forças para conquistar meus objetivos. Nos momentos mais árduos, foi a ELE quem recorri para poder continuar seguindo em frente.

Aos meus pais, **Ana Maria Cabral de Souza** e **Robson Lacerda de Lima**, por todo o incentivo para que eu pudesse realizar as metas que tanto almejei na minha vida. Sem o esforço e empenho deles, não seria possível alcança-las.

À minha irmã, **Gisele Cabral Lacerda**, que sempre esteve comigo me apoiando em todos os momentos da minha vida.

À minha segunda mãe de coração, **Angelita Marques Lacerda**, por todo o amor, atenção e carinho. Sem seu suporte, tudo seria mais difícil.

Às estudantes de iniciação científica, **Sabrina Pereira**, **Francielly Flor**, **Mayara Souza**, **Gleyciele Albuquerque** e **Maria Eduarda**, pelo empenho para realização de várias atividades da pesquisa.

À minha companheira de pesquisa, **Kássia Oliveira**, meu muito obrigado pela amizade e por todo o suporte que me concebeu, sou muito grato por tudo! Agradeço também a meu amigo de laboratório, **André Terácio**, por ter me incentivado e ajudado muito na fase final da pesquisa.

À minha mãe adotada do laboratório, **Profª Drª Tereza Deiró**, por ter me acolhido e me dado forças para superar as dificuldades e continuar seguindo em frente, mesmo em momentos difíceis em que estive desmotivado.

Ao casal mais prestativo do laboratório, **Prof Dr José Antônio Santos** e **Profª Drª Raquel Aragão**. Sei que posso contar com vocês para qualquer socorro!

À minha amiga, **Manuella da Luz**, com quem tive o prazer de conhecer nos primeiros dias da faculdade. Fico muito feliz por estarmos trilhando juntos nossa carreira acadêmica.

Aos meus amigos do laboratório de Fisioterapia Cardiopulmonar (Lacap), em especial **Peterson Filipe Pinheiro**, pela sua amizade ao longo desses dois anos de mestrado.

Às minhas grandes amigas de faculdade, **Luana Teles**, **Vivianne Bastos**, **Erika Oliveira**, **Leandra Ferraz**, **Juliana Albuquerque**, **Rebeca de Castro**, que não deixam a distância diminuir nossa amizade!

Aos meus grandes amigos, **Fábio Nogueira, Rodrigo Félix e Bruno Sabino**. Sei que pode passar o tempo que for, nossa amizade sempre prevalecerá.

À grande contribuição da minha có-orientadora, **Profª Drª Kelli Nogueira**, que foi peça chave nessa pesquisa. Agradeço por todos os ensinamentos e também por ter acreditado no meu potencial!

À minha professora orientadora, **Profª Drª Ana Elisa Toscano**, agradeço por ter me apresentado encantador campo da pesquisa científica! Graças a sua contribuição, tive a oportunidade de dar um rumo diferente na minha vida profissional.

Aos **docentes da Pós-graduação em Fisioterapia**, pelo conhecimento que nos foi transmitido.

Ao **Departamento de Nutrição**, pela estrutura e apoio para a realização do projeto.

À minha conselheira **Niège Melo**, por ter me acolhido desde o primeiro dia que fui na secretaria da Pós-Graduação de Fisioterapia! Muito obrigado por toda sua ajuda.

À **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)** pelo apoio financeiro.

“Todos nós temos nossas máquinas do tempo. Algumas nos levam pra trás, são chamadas de memórias. Outras nos levam pra frente, são chamadas de sonhos”.
(Jeremy Irons).

RESUMO

A capacidade de reação de um organismo aos desafios ambientais com mudanças no seu fenótipo, isto é, na sua forma, estado, desenvolvimento ou padrão de atividade, denomina-se plasticidade fenotípica. Uma das variáveis mais bem documentadas que interferem na plasticidade fenotípica é a nutrição. Atualmente, a desnutrição proteica continua a ser um grave problema de saúde que afeta recém-nascidos e crianças, especialmente dos países em desenvolvimento. Nesses países, a paralisia cerebral (PC) está relacionada a más condições materno-infantis de nutrição. Comumente, crianças com PC apresentam dificuldades na alimentação, podendo levar à inadequada ingestão de nutrientes e desnutrição. Contudo há uma escassez de dados na literatura científica sobre o efeito da desnutrição no comportamento alimentar de indivíduos com PC, sobretudo os aspectos morfológicos e funcionais da mastigação. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi verificar em um modelo experimental de paralisia cerebral, o efeito da desnutrição sobre o padrão sensório-motor da mastigação em ratos submetidos ao modelo experimental de PC. Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem *Wistar*, distribuídos aleatoriamente nos grupos: grupo Normonutrido (NC, n=15), Normonutrido PC (NPC, n=15); Desnutrido (DC, n=15) e Desnutrido PC (DPC, n=15). Os animais do grupo PC foram submetidos à um modelo experimental baseado na combinação da anóxia perinatal associado à restrição sensório-motora das patas posteriores. Foram avaliados nos diferentes grupos: ganho de peso corporal, a ingestão de leite materno e ração, os parâmetros motores e sensoriais da mastigação e propriedades musculares (peso e tipagem muscular) do masseter e digástrico. Animais do grupo Desnutrido PC, apresentaram redução mais severa do peso corporal ($P<0,05$), ingestão de leite ($P<0,05$), consumo de ração ($P<0,05$), frequência mastigatória, quantidade de reações de “gosto” ($P<0,05$), peso muscular e aumento na proporção das fibras tipo IIA ($P<0,05$). A desnutrição proteica acentua os danos no controle sensório motor da mastigação, em animais submetidos à paralisia cerebral.

PALAVRAS-CHAVE: Desnutrição proteica. Paralisia Cerebral. Mastigação. Ratos.

ABSTRACT

The responsiveness of an organism to environmental challenges with changes in their phenotype, in its form, state, development or activity is called phenotypic plasticity. One of the best documented variables that affect the phenotypic plasticity is nutrition. Currently, protein malnutrition remains a serious health problem that affects infants and children, especially in developing countries. In these countries, cerebral palsy (PC) is related to poor maternal and child nutrition conditions. Commonly, children with PC have feeding difficulties and may lead to inadequate ingestion of nutrients and malnutrition. However there is a paucity of data in the scientific literature about the effect of malnutrition in feeding behavior of individuals with PC, especially the morphological and functional aspects of mastication. In this way, the aim of this study was to investigate in an experimental model of cerebral palsy, the effect of malnutrition on the sensorimotor pattern of chewing in rats submitted to PC experimental model. 60 Wistar rats were randomly divided into groups used: Nourished (NC, n=15), Nourished PC (NPC, n=15), Malnourished (DC, n=15) and Malnourished PC (DPC, n=15). The animals of PC groups were submitted to an experimental model based on the combination of perinatal anoxia associated with sensorimotor restriction of the hind paws. We evaluated in the different groups: body weight gain, the ingestion of breast milk and pellets of casein, the motor and sensory parameters of mastication and muscle properties (weight and muscle typing) of the masseter and digastric. Animals from malnourished PC group showed the most severe reduction in body weight ($P<0,05$), milk intake ($P<0,05$), feed intake ($P<0,05$), masticatory frequency ($P<0,05$), number of hedonic reactions ($P<0,05$), increased muscle weight and the proportion of type IIA muscle fibers ($P<0,05$). Protein malnutrition accentuates the damage to the sensory motor control of mastication, in animals submitted to cerebral palsy model.

Key words: Protein malnutrition. Cerebral Palsy; Mastication; Rats.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	14
2. INTRODUÇÃO.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Plasticidade Fenotípica	18
3.2 Desnutrição Perinatal.....	19
3.3 Paralisia Cerebral e Modelos Experimentais.....	21
3.4 Paralisia Cerebral e Dificuldades na Alimentação.....	24
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo Geral	30
4.2 Objetivos Específicos	30
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 Manipulação dos animais.....	31
5.2 Escolha das ratas para acasalamento	32
5.3 Manipulação da dieta das ratas e formação dos grupos experimentais.....	32
5.4 Formação dos grupos experimentais e desenho de estudo.....	33
5.5 Modelo experimental de paralisia cerebral.....	34
5.6 Análise do peso corporal.....	36
5.7 Ingestão de leite materno.....	36
5.8 Análise dos parâmetros motores da mastigação	37
5.9 Análise da sensibilidade intra-oral.....	38
5.10 Coleta dos músculos da mastigação.....	38
5.11 Análise histoquímica	39
5.12 Medidas de desfecho e definição das variáveis	40
5.13 Análise estatística	41
6. RESULTADOS	42
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE A - Artigo de Revisão Sistemática: Funções Orofaciais em Modelos Experimentais de Paralisia Cerebral: Uma Revisão Sistemática.....	54

APÊNDICE B - Artigo Original: Modelo Experimental de Paralisia Cerebral Causa Déficits no Padrão Sensório-motor da Mastigação em Ratos.....	75
ANEXOS	99

1. APRESENTAÇÃO

Esta pesquisa faz parte de um dos campos de estudo do grupo “Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica”, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e do Laboratório de Exercício Físico e Plasticidade Fenotípica do CAV – UFPE. O objetivo do estudo foi investigar os efeitos da paralisia cerebral experimental associado à desnutrição perinatal, sobre o controle sensório-motor da mastigação.

O modelo experimental adotado para essa pesquisa foi o modelo proposto por Strata e colaboradores que consiste na combinação da anóxia perinatal associado à restrição sensório-motora das patas posteriores em ratos. Adotamos tal modelo devido o mesmo ser eficaz em reproduzir diversos danos em funções vitais para o organismo, como a coordenação motora, equilíbrio, marcos do desenvolvimento motor e atividade locomotora. No entanto não há relatos na literatura sobre o uso desses modelos na avaliação das comorbidades orofaciais, sobretudo os aspectos morfológicos e funcionais da mastigação.

Além disso, devido à desnutrição fazer parte do cenário da paralisia cerebral, sobretudo em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, surgiu o interesse em avaliar como a desnutrição perinatal é capaz de influenciar no curso da instalação das sequelas mastigatórias induzidas pela doença.

Os dados obtidos resultaram em um artigo de Revisão Sistemática “Funções Orofaciais em Modelos Experimentais de Paralisia Cerebral: Uma Revisão Sistemática”, que será submetido à Revista, *Journal of Oral Rehabilitation* conceito A2 para a área 21 da CAPES; e um artigo original “Implicações da Paralisia Cerebral Experimental Associado à Desnutrição Perinatal sobre o Controle Sensório-motor da Mastigação em Ratos”, que será submetido à revista *Physiology and Behavior*, conceito A1 para a área 21 da CAPES.

O presente exemplar está estruturado da seguinte maneira:

1. Introdução
2. Revisão de Literatura
3. Objetivos
4. Materiais e Métodos
5. Resultados – Apresentados como formato de um Artigo de Revisão Sistemática e um Artigo Original

6. Considerações Finais e Perspectivas
7. Referências (do corpo da Dissertação)
8. Apêndice A: Artigo de Revisão Sistemática: Funções Orofaciais em Modelos Experimentais de Paralisia Cerebral: Uma Revisão Sistemática.
9. Apêndice B: Artigo Original: Modelo Experimental de Paralisia Cerebral Causa Déficit no Padrão Sensorio-motor da Mastigação em Ratos.
10. Anexos

2. INTRODUÇÃO

O fenótipo de um indivíduo é a expressão última da interação do seu genótipo (conjunto de gens) e do ambiente (West-Eberhard, 1986). O estabelecimento do fenótipo nos mamíferos tem na fase perinatal de crescimento e desenvolvimento um período vulnerável a múltiplos fatores ambientais (Baker, 1991). Neste contexto, surge o conceito de plasticidade fenotípica, um genótipo poderia expressar-se de modo diverso a depender da particular interação com o ambiente, revelando a capacidade do organismo em reagir aos desafios impostos pelo ambiente, modificando a sua forma, estado, movimento ou padrão de atividade (West-Eberhard, 1986). Evidências epidemiológicas e experimentais têm demonstrado que variações ambientais na vida precoce podem levar a mudanças fenotípicas com repercussões permanentes nos sistemas fisiológicos (Hales et al., 1991; Morgane, 1993).

Um dos fatores mais bem documentados no estudo da plasticidade fenotípica são os nutricionais (Moura et al., 2008). A mudança da qualidade e/ou quantidade do aporte nutricional, durante os períodos críticos do desenvolvimento, pode resultar em alterações irreversíveis na estrutura e função dos órgãos (Toscano et al., 2008). Estudos revelam que a desnutrição proteica perinatal pode resultar em danos em eventos ontogenéticos do sistema nervoso, incluindo alterações na divisão celular, migração neuronal, diferenciação das células e prejuízos na mielinização (Moura et al., 2008; Forbes et al., 1977).

Atualmente a desnutrição proteica continua a ser um grave problema de saúde que afeta milhares de recém-nascidos e crianças, especialmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (Black et al., 2008). Nesses países, a má condição materno-infantil de nutrição é considerada uma das principais causas que justificam o aparecimento de distúrbios neurológicos, como a paralisia cerebral (PC) (Himmelman et al., 2006; Serdaroglu et al., 2006).

A paralisia cerebral, também denominada de encefalopatia crônica não progressiva da infância, é resultante de uma lesão estática e não progressiva, que acomete o sistema nervoso central em desenvolvimento (Kriger, 2006; Mancini et al., 2002). Comumente crianças com PC apresentam dificuldades na alimentação, levando a um quadro de desnutrição (Gisel, 1993; Galler et al., 1985). As dificuldades na alimentação estão associadas á múltiplas sequelas

físicas, psicológicas e cognitivas, sendo uma das mais incapacitantes, as disfunções orofaciais (Andrew, Parr, Sullivan, 2013; Santos et al., 2012; Vik T et al., 2001). O atraso no desenvolvimento da função mastigatória, por exemplo, limita a habilidade da criança em triturar o alimento em pequenas partículas para formação de um bolo alimentar adequado para deglutição (Carvalho et al., 2011). Associado a isso, indivíduos com distúrbios neurológicos apresentam alterações na percepção do sabor dos alimentos, podendo contribuir para o pobre estado nutricional (Schiffman et al., 2002). Contudo não há relatos na literatura se tais alterações nos aspectos funcionais da mastigação, repercutem sobre a integridade da estrutura dos músculos mastigatórios. Além disso, pouco se sabe como a desnutrição, cenário marcante de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, pode intensificar a injúria neurológica primária e agravar o quadro clínico de crianças com PC.

Neste contexto, existem alguns modelos experimentais que tentam reproduzir os danos causados pela PC e isso permite, dentro dos devidos limites, a extrapolação para humanos (Johnston et al., 2005). Dentre os modelos experimentais, um dos que mais se destacam é o modelo baseado nos experimentos de Strata e colaboradores, por ser eficaz em reproduzir múltiplas sequelas físicas características da PC (Marcuzzo et al., 2008; Strata et al., 2004). Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar, em modelo experimental de paralisia cerebral em ratos submetidos e não submetidos à desnutrição perinatal, o controle sensório-motor da mastigação, bem como o peso e distribuição dos tipos de fibras do músculo masseter e digástrico.

Nossa hipótese é que a desnutrição proteica é capaz de acentuar os danos musculares e no controle sensório motor da mastigação em ratos submetidos ao modelo experimental de paralisia cerebral.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plasticidade Fenotípica

O fenótipo de um indivíduo é a expressão última da interação do seu genótipo (conjunto de gens) e do ambiente (West-Eberhard, 1986). O estabelecimento do fenótipo nos mamíferos tem na fase perinatal, um período vulnerável a múltiplos fatores ambientais (Baker, 1991). O período perinatal, composto sobretudo pelas fases iniciais da vida (gestação e lactação), é considerado crítico para o crescimento e desenvolvimento dos mamíferos (Gluckman et al., 2007). São momentos específicos da vida em que o organismo sofre modificações estruturais e fisiológicas importantes, para a formação dos órgãos e tecidos (Morgane, 1993).

Evidências epidemiológicas e experimentais demonstraram que variações ambientais quando incidem sobre o período perinatal, podem levar a mudanças fenotípicas com repercussões permanentes no metabolismo, estrutura e função dos sistemas fisiológicos (Hales et al., 1991; Morgane, 1993). Neste contexto, o fenômeno biológico na qual o organismo é capaz de reagir aos desafios impostos pelo ambiente modificando a sua forma, estado, movimento ou padrão de atividade, é chamado de plasticidade fenotípica (West-Eberhard, 1986). Portanto, a plasticidade fenotípica permite que uma variação de fenótipos possam ser expressos por um único genótipo, a depender da particular interação do organismo com o meio ambiente (Gluckman et al., 2007).

Uma das variações mais bem documentadas no estudo da plasticidade fenotípica são os fatores nutricionais (Moura et al., 2008). Um suprimento adequado de nutrientes é fundamental para o crescimento e desenvolvimento em todos os sistemas biológicos (Morgane, 1993). Nesse contexto, a nutrição materna interfere sobre o crescimento e desenvolvimento fetal (Black et al., 2008). A falta ou o aumento do aporte nutricional durante períodos críticos do desenvolvimento podem resultar em alterações permanentes na estrutura e função de órgãos (Ozanne, Hales, 2004). Associado a isso, a restrição neonatal de proteína materna está relacionada com um menor estoque de nutrientes maternos e, subsequentemente, menor transferência de nutrientes para os filhotes, o que está relacionado ao decréscimo do crescimento pós natal (Hallal et al., 2012). Assim, a quantidade e a qualidade da nutrição durante os períodos críticos do desenvolvimento pode ter consequências permanentes para a vida das pessoas afetadas (Hallal et al., 2006).

A nutrição dos mamíferos durante o período pós-natal precoce é representada pelo aleitamento materno (Smotherman, 1994). Inicialmente os nutrientes e fluidos são obtidos pelo mamilo materno através do comportamento de sucção (Westneat, Hall, 1992). Entretanto à medida que o animal se desenvolve, o comportamento de sucção é substituído gradativamente pela mastigação (Westneat, Hall, 1992). Essa transição no comportamento alimentar reflete a maturação neuromuscular e funcional da mastigação que ocorre durante o período crítico do desenvolvimento, particularmente na gestação e lactação (Brocard et al., 2006). Em estudos experimentais foi observado em ratos, os primeiros movimentos mastigatórios e a ingestão de alimentos sólidos no décimo segundo dia de vida pós natal (Westneat, Hall, 1992). Porém o amadurecimento do padrão motor da mastigação é finalizado no vigésimo primeiro dia de vida pós-natal (Bottinelli et al., 1991; Westneat, Hall, 1992). Nessa fase, alguns estímulos ambientais, como a escassez na oferta de alimento durante a gestação e lactação, podem interferir sobre o desenvolvimento de diversos órgãos e tecidos (Lucas, 1991).

3.2 Desnutrição Perinatal

A privação de nutrientes durante o período perinatal pode resultar em alterações irreversíveis na estrutura e função de diversos sistemas biológicos (Lucas, 2005). Um dos sistemas mais sensíveis à agressões nutricionais durante o período perinatal é o sistema muscular esquelético (Toscano et al., 2008). Estudos revelam que a desnutrição perinatal pode danificar permanentemente a estrutura e função muscular (Bedi et al., 1982). Em relação aos músculos mastigatórios, as principais modificações observadas, ocorrem após o nascimento, quando o padrão do consumo alimentar muda de sucção para mastigação (Westneat, Hall, 1992; Bredman et al., 1992). Evidências experimentais demonstraram que a desnutrição proteica perinatal provocou redução do peso muscular, área e perímetro das fibras musculares do Masseter (Ferraz-Pereira et al., 2015) e Pterigóide Medial (Parada-Simão et al., 2011).

Outra propriedade do tecido muscular sensível às agressões nutricionais é a distribuição dos tipos de fibras musculares (Prakash, Fournier, Sieck, 1993). Os músculos da mandíbula apresentam uma composição heterogênea, quanto ao tipo de fibras musculares (Korfage, Van Eijden, 2003). Essas fibras diferem nas propriedades contráteis, produção da força máxima, velocidade de contração e no

grau de resistência a fadiga (Schiaffino, Reggiani, 1996). Durante o período pós-natal precoce, o número de fibras rápidas tipo IIB aumentam rapidamente para se adaptar ao aumento das demandas funcionais, em virtude da mastigação exigir maiores forças de contração muscular (Shida et al., 2005). As fibras musculares do tipo IIB são aquelas que apresentam a maior velocidade de contração e produção de força máxima, necessárias para realização dos golpes mastigatórios (Kawai et al., 2009). No entanto, Ferraz e colaboradores observaram que a desnutrição proteica induziu modificações na distribuição dos tipos de fibras musculares no músculo masseter, reduzindo a proporção de fibras tipo IIB (Ferraz-Pereira et al., 2015). Associado a essas alterações morfológicas, ratos submetidos à desnutrição proteica neonatal, apresentaram prejuízo em parâmetros motores da função mastigatória, comprometendo a funcionalidade da mastigação (Ferraz-Pereira et al., 2015). No entanto não foi avaliado se tais prejuízos interferem sobre o consumo alimentar desses animais.

Propriedades sensoriais envolvidas na ingestão do alimento também podem ser modificadas por fatores nutricionais (Cabanac, Fantino, 1977). Além disso, o prazer da ingestão alimentar é amplamente modulado pelo estado nutricional do indivíduo (Badonnel et al., 2012). Evidências experimentais demonstraram que a desnutrição no período de lactação, afetou a seleção do alimento, em ratos aos 90 dias de vida (Cabraia et al., 2001). Também foi observado em ratos que a restrição crônica do consumo alimentar induziu prejuízos na função olfatória, observados durante a procura e aquisição do alimento (Badonnel et al., 2012). Nesse sentido, os mamíferos dependem de pistas olfatórias e da percepção do sabor para discriminar e determinar a palatabilidade e o valor hedônico do alimento (Badonnel et al., 2012). O valor hedônico do alimento, definido como prazer proporcionado pela alimentação, exerce um papel fundamental na regulação do apetite e do consumo alimentar e mudanças no estado nutricional podem levar a modificações a reações ao odor (Jiang et al., 2008). No entanto não há relatos na literatura se a desnutrição é capaz de modificar a reatividade ao sabor em modelos experimentais. Associado à essas mudanças em aspectos sensorio-motores da ingestão alimentar, o impacto na função mastigatória parece ser ocasionado por um dano no circuito neural envolvido na modulação dos movimentos mastigatórios (Andrew, Parr, Sullivan, 2011).

A maturação do padrão sensório-motor da mastigação ocorre durante o período de desenvolvimento do sistema nervoso (Westneat, Hall, 1992). A privação de nutrientes durante as fases iniciais da vida pode causar atraso no desenvolvimento cerebral (Morgane, Mokler, Galler, 2002). Evidências experimentais demonstraram que a desnutrição proteica perinatal pode resultar em alterações em eventos ontogenéticos do sistema nervoso, incluindo danos na divisão celular, migração neuronal, diferenciação celular e prejuízos na mielinização (Forbes et al., 1977).

Atualmente, a desnutrição proteica continua a ser um grave problema de saúde que afeta recém-nascidos e crianças, especialmente dos países em desenvolvimento, e é uma importante causa de baixo peso ao nascer (Black et al., 2008). Nestes países, a incidência de desordens como encefalopatia hipóxico-isquêmica durante o período perinatal está aumentada, especialmente quando associado ao peso ao nascer abaixo de 1.500 g (Subramanian, 2009). Neste contexto, estudos revelam que o baixo peso ao nascer é considerado um dos principais fatores de risco de transtornos neurológicos, como a Paralisia Cerebral (PC) (Colver, Fairhurst, Pharoah, 2014).

Nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, a PC está relacionada a problemas gestacionais, atendimento médico e hospitalar inadequado, dada a demanda das condições clínicas apresentadas principalmente por crianças nascidas antes da correta maturação neurológica (Himmelman et al., 2006; Serdaroglu et al., 2006). Ademais, umas das principais causas que justificam o aparecimento da PC nesses países, são as más condições materno-infantis de nutrição (Himmelman et al., 2006; Serdaroglu et al., 2006). Estudos revelam que o pobre estado nutricional pode compor os efeitos primários da injúria cerebral em crianças com PC e ter seu quadro clínico agravado (Andrew, Sullivan, 2010). No entanto, evidências epidemiológicas e experimentais que documentem os efeitos da má nutrição na saúde de crianças com PC são limitadas (Kuperminc, Stevenson, 2008).

3.3 Paralisia Cerebral e Modelos Experimentais

A Paralisia Cerebral (PC) compreende um grupo de distúrbios permanentes no desenvolvimento do movimento e postura, causando limitação na atividade, que é atribuída a um distúrbio não progressivo que ocorre durante o desenvolvimento do

cérebro fetal ou infantil (Bax et al., 2005). As alterações motoras da paralisia cerebral são geralmente acompanhadas por distúrbios na sensação, percepção, cognição, comunicação e comportamento (Rosenbaum et al., 2006), acometendo duas a cada mil crianças, sendo a causa mais comum de incapacidade motora crônica na infância (Yeargin-Allsopp et al., 2008). Todavia, vale ressaltar que em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, a incidência é maior, pois esses países reúnem condições mais favoráveis à ocorrência de problemas crônicos como a PC (Himmelmann, 2013). No Brasil, estima-se que a cada 1.000 crianças nascidas vivas, sete são portadoras de PC, e que cerca de 30.000 a 40.000 novos casos ocorrem por ano (Mancini et al., 2002).

Na Paralisia Cerebral, a área cerebral afetada reflete diretamente as incapacidades resultantes, sendo algumas áreas cerebrais mais susceptíveis que outras (Koman et al., 2004; Jones et al., 2007). A incapacidade de controlar funções motoras ocorre, por exemplo, em lesões do motoneurônio superior, onde há redução da aferência dos tratos retículoespinal e corticoespinal ao cérebro, diminuindo o número de unidades motoras efetivas (Koman et al., 2004; Bax et al., 2005).

O desenvolvimento global é afetado negativamente, prejudicando diretamente a capacidade exploratória, de linguagem, aprendizado e independência (Jones et al., 2007). Os sinais característicos são assimetrias posturais, espasticidade, aumento de reflexos, atrofia e fraqueza muscular, distúrbios do movimento, ataxia, rigidez e marcha característica em tesoura (Koman et al., 2004; Krigger, 2006). Há repercussões negativas sobre o processo de crescimento, como no comprimento e/ou na estrutura muscular e dos ossos (Novacheck, Gage, 2007), assim como anormalidades no tamanho das fibras musculares e transição de seus fenótipos de lentas para rápidas, observadas em biópsias de fibras musculares de paciente com PC (Ito et al., 1996; Marbini et al., 2002).

Além das manifestações primárias relacionadas a desordens no tônus, postura e movimento, crianças com PC usualmente apresentam comorbidades incluindo problemas com a alimentação e um pobre estado nutricional (Krigger, 2006). Uma alimentação equilibrada é fundamental para manutenção da saúde e bem estar do indivíduo (Reilly, Skuse, Pobleto, 1996). Entretanto a precariedade na habilidade de se alimentar observada em crianças com PC provoca aumento do risco de mortalidade e está associado com pior prognóstico da doença (Sullivan et al., 2000). Estima-se que 40% das crianças com PC apresentam disfunção no

controle da saliva (Reid et al., 2012), 65% possuem déficits na mastigação (Benfer et al., 2014) e 85% apresentam disfagia (Benfer et al., 2012). No entanto, outros aspectos como funções orais sensoriais são significativamente menos exploradas na literatura (Edvinsson, Lundqvist, 2015).

Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, mais de 90% das crianças com PC apresentam dificuldades na alimentação levando a moderada ou severa desnutrição (Sullivan et al., 2000). Há relatos que a desnutrição é a principal causa de morte de crianças com PC em alguns países subdesenvolvidos (Khan et al., 1998). Contudo a escassez de evidências experimentais que poderiam esclarecer os mecanismos subjacentes às dificuldades na alimentação, limita a eficácia de intervenções terapêuticas em reverter o impacto no quadro nutricional dessas crianças.

Neste contexto, estudos que desenvolvem modelos experimentais de PC utilizando animais tem fornecido grandes avanços e conhecimentos importantes sobre a patogênese da doença (Johnston et al., 2005). Tais estudos vêm contribuindo na construção de potenciais terapias que visam minimizar a incapacidade crônica da doença (Oliveira, 2009). Os modelos experimentais replicam uma ou mais características da PC nos animais em desenvolvimento. No entanto existe uma significativa heterogeneidade nesses modelos (Johnston et al., 2005). A variabilidade nos modelos desenvolvidos envolvem diferentes aspectos da síndrome, tais como o tempo, mecanismo e extensão da injúria e diferentes espécies (Johnston et al., 2005). Os modelos experimentais mais estudados na literatura são aqueles baseados na injeção de Lipopolissacarídeo, hipóxia-isquemia perinatal, hemorragia interventricular e desuso dos membros posteriores. Esses modelos tentam reproduzir os danos causados pela PC e isso permite, dentro dos devidos limites, a extrapolação para humanos. No entanto, os modelos experimentais baseados em um único insulto, parecem não ser eficazes em reproduzir o fenótipo típico da criança com PC (Marcuzzo et al., 2010). Modelos experimentais induzidos por combinação de insultos, conseguem mimetizar mais características da doença (Marcuzzo et al., 2010). Diante disso, o modelo proposto por Strata e colaboradores que consiste na combinação da anóxia perinatal associado à restrição sensório-motora das patas posteriores, reproduz diversas anormalidades na atividade locomotora, coordenação, equilíbrio, além de atrasos nos marcos do desenvolvimento motor (Strata et al., 2004).

Quanto aos parâmetros avaliados em modelos experimentais de PC, a maior parte dos estudos buscam investigar os mecanismos subjacentes aos achados neurológicos e modificações na atividade locomotora. No entanto, há uma escassez de estudos na literatura que investiguem os processos relacionados ao comportamento alimentar e às funções orofaciais, sobretudo a mastigação. Nesse sentido, é importante entender o impacto destes modelos sobre a mastigação, haja vista que estudos mostram efeitos deletérios na histologia do músculo esquelético e na organização do córtex somatossensorial primário como resultado da anóxia combinada à imobilização dos membros posteriores em ratos (Stigger et al., 2011). Além do mais, somente o desuso é capaz de reduzir o feedback proprioceptivo dos membros posteriores e levar à remodelação no córtex somatossensorial (Langlet et al., 1999; Coq et al., 2008) e no córtex motor (Strata et al., 2004). A remodelação nessas áreas cerebrais provoca uma modificação na ativação neuronal (Dupont et al., 2003) que pode contribuir com a performance anormal das habilidades motoras vista nestes animais. Assim, a atividade motora e o estímulo proprioceptivo parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento motoneuronal (Inglis et al., 2000). Dessa forma, a utilização do rato como animal experimental, obedecendo aos critérios éticos, permite a observação do desenvolvimento de comportamentos e suas sequelas, os quais poderão ser evidenciados na PC induzida (Strata et al., 2004), auxiliando a elucidar as modificações na estrutura e função do sistema estomatognático, associadas as dificuldades na alimentação.

3.4 Paralisia Cerebral e Dificuldades na Alimentação

Comumente, crianças com disfunções neuromotoras apresentam dificuldades na alimentação (Gisel, 1993). Essas dificuldades são resultantes de anormalidades nas estruturas anatômicas envolvidas com a preparação oral do alimento, podendo resultar em severa disfunção alimentar e inadequada ingestão nutricional (Sullivan, et al., 2000). Alterações faciais, no palato e garganta (Jersey, 1975), a pobre dentição (Sullivan, 2013), o desenvolvimento de cáries (Rodrigues dos Santos et al., 2003) e as modificações periodontais (Rodrigues dos Santos et al., 2003), são exemplos de anormalidades observadas em crianças com PC. Ademais, essas alterações morfológicas das estruturas crânio-faciais, repercutem de forma deletéria sobre a integridade das funções motoras orofaciais, essenciais para a trituração e processamento dos alimentos (Reilly, Skuse, 1992).

O pobre consumo de nutrientes em crianças com PC é reflexo de múltiplas alterações motoras orofaciais (Vik et al., 2001). A disfunção nos movimentos da língua por exemplo, pode causar perda do alimento e dificuldades na formação do bolo alimentar (Andrew, Parr, Sullivan, 2012). Movimentos limitados da língua, tais como ausência ou redução da lateralização, promove controle precário do alimento na cavidade oral, e inabilidade em mastigar e deglutir (Andrew, Parr, Sullivan, 2012).

Associado aos déficits no controle dos movimentos da língua, a fraca sucção e a redução no repertório dos movimentos mastigatórios, compromete a eficácia da preparação oral do alimento no interior da cavidade oral (Andrew, Parr, Sullivan, 2012; Reilly, Skuse, 1992). A Instabilidade da mandíbula durante a mastigação limita a abertura e o fechamento gradual coordenado, comprometendo a manipulação do alimento na cavidade oral (Andrew, Parr, Sullivan, 2012). O prejuízo na harmonia dos movimentos mandibulares dificulta a habilidade da criança com PC em reter o alimento na boca, causando perdas excessivas do alimento (Benfer et al., 2014; Sullivan, 2013). Além disso, a incapacidade da criança com PC em deglutir de forma segura, dificulta o trânsito e a propulsão do bolo alimentar para faringe com as vias aéreas protegidas (Arverdson, 2013). Diante destas dificuldades, a ingestão de alimentos sólidos parece ser mais difícil para indivíduos com PC que apresentam função motora oral danificada e fraqueza muscular (Weir et al., 2013). Em razão disto, dietas com consistências líquidas e semi-sólidas são a primeira escolha para estes indivíduos (Andrew, Parr, Sullivan, 2012; Weir et al., 2013).

Com o propósito de investigar se as modificações nas funções orofaciais são agravadas pela desnutrição perinatal, surge-se a necessidade de avaliar o grau de comprometimento dessas alterações e a que mecanismos estão associados em modelos experimentais de PC. Os parâmetros motores da função mastigatória (duração do período de incisão e da mastigação rítmica, número de ciclos mastigatórios e frequência mastigatória), são considerados indicadores da dificuldade do processamento alimentar, sendo portanto eficazes em avaliar o grau da eficiência mastigatória (Mostafaezur et al., 2012). O período de incisão é caracterizado por sucessivas incisões seguido da condução do alimento para a parte posterior da cavidade oral, iniciando o período da mastigação rítmica (Ferraz-Pereira et al., 2015; Mostafaezur et al., 2012) (Figura 1 e 2). No período da mastigação rítmica, ocorre a trituração do alimento a partir de movimentos vigorosos e de velocidade da mandíbula, denominados de ciclos mastigatórios (Ferraz-Pereira et

al., 2015; Mostafaezur et al., 2012) (Figura 1 e 2). Contudo, não há relatos na literatura sobre o impacto em tais parâmetros motores induzido por modelos experimentais de PC.



Figura 1 e 2: Esquema representativo dos parâmetros motores da mastigação (figura 1). Observação do animal no plano sagital por meio da filmagem para extração dos parâmetros avaliados (figura 2).

Além dos parâmetros motores da função mastigatória, comprometimentos sensoriais podem reduzir a habilidade da procura e apreciação do alimento, levando a inadequada ingestão de nutrientes (Toth, Poehlman, 2000). Durante a alimentação, os receptores sensoriais intraorais, sobretudo as papilas gustativas situadas na superfície da língua, são ativados durante a execução dos movimentos mastigatórios (Yamada, Yamamura, Inoue, 2005). Esses receptores estão envolvidos em fornecer o feedback sensorial ao cérebro e guiar os movimentos mastigatórios da mandíbula (Yamada, Yamamura, Inoue, 2005). Nesse contexto, experimentos utilizando animais, têm ajudado a compreender as respostas provocadas por variados tipos de sabores dos alimentos (Chao – Yi HO, Berridge, 2014). Esses experimentos analisam as expressões faciais e corporais de animais submetidos a diferentes estímulos do sabor (Chao – Yi HO, Berridge, 2014). Como humanos e outros mamíferos, reagem de forma semelhante aos estímulos do sabor, o teste de reatividade intra-oral, aplicado em ratos, tem sido uma boa ferramenta na aquisição de dados potencialmente extrapoláveis para humanos (Wyvell, Berridge, 2000). A figura 3 ilustra a semelhança das expressões faciais induzidas por estímulos gustativos em diferentes mamíferos (Figura 3).

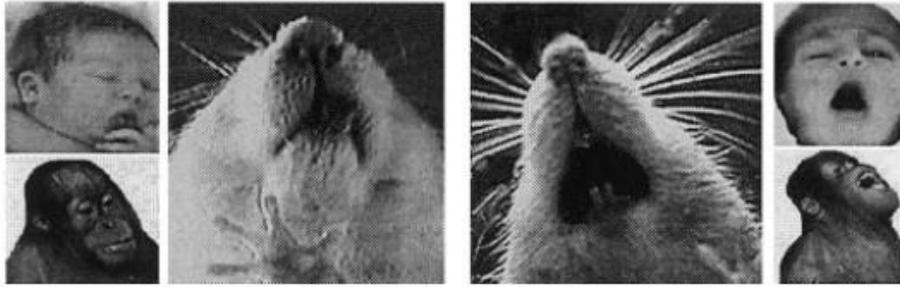


Figura 3: reações do sabor avaliadas em mamíferos neonatos. Foto retirada do artigo “*Intra-Accubens Amphetamine Increases the Conditioned Incentive Saliency of Sucrose Reward: Enhancement of Reward “Wanting” Without Enhanced “Linking” or Response Reinforcement*”, 2000)

A administração de soluções de “gosto”, como a sacarose, provocam respostas prazerosas para o animal, tais como, protrusões e movimentos laterais da língua e “lamber” as patas (Grill, Norgren, 1978). No entanto, não há relatos na literatura sobre as alterações na percepção do sabor dos alimentos em crianças com PC. Nesse sentido, torna-se relevante avaliar a influência da reatividade ao sabor na modulação dos movimentos mastigatórios, bem como do consumo alimentar, em modelos experimentais de PC.

Um dos principais fatores que contribuem para a instalação das disfunções orofaciais, são as alterações no tônus muscular observado nos músculos constituintes do sistema estomatognático (Benfer et al., 2012). O dano no sistema piramidal (visto na PC) pode dar origem a alterações no tônus muscular, e causar lesões nos padrões eferentes (motor), que, por sua vez, pode gerar um impacto nos músculos da mandíbula, bochechas, lábios, língua, palato e faringe, que manifestam funcionalmente como dificuldades na alimentação (Benfer et al., 2012). Os lábios podem ser hipotônicos, hipertônicos ou apresentar uma variação de tônus com movimentos constantes da mandíbula durante o repouso (Andrew, Parr, Sullivan, 2013). O pobre controle dos lábios pode causar perda do alimento e fluidos, resultando em declínio no consumo alimentar e contribuindo para o pobre estado nutricional (Morgan, Reilly, 2006; Andrew, Parr, Sullivan, 2013). O tônus muscular normal da bochecha permite que o alimento se mantenha no interior da cavidade oral associado ao suporte dos lábios e movimentos da língua (Andrew, Parr, Sullivan, 2013; Carvalho et al., 2011). A hipotonia da língua por sua vez resulta em retenção do alimento nas laterais da cavidade oral impedindo a formação de um bolo alimentar adequado (Andrew, Sullivan, 2010).

Quanto aos músculos mandibulares, a hipertonia pode afetar os músculos que elevam a mandíbula (Ortega et al., 2008). Tais alterações musculares se manifestam em movimentos mandibulares descoordenados e redução na força de mordida durante a ingestão alimentar (Nakagima et al., 1988). A hipertonia e as desordens no movimento, reflexo das modificações generalizadas no tônus muscular, promove um alto gasto metabólico (Lundberg, 1976), no qual não é compensado pela ingestão calórica diária, comprometendo o balanço dos macronutrientes e prejudicando sobretudo a qualidade de vida dessas crianças (Sangermano et al., 2014). Entretanto, não foi avaliado o impacto provocado pela alteração do tônus dos músculos mastigatórios, em propriedades musculares importantes, como a distribuição dos tipos de fibras musculares.

É importante evidenciar também que a performance motora oral limitada da mastigação e da deglutição em crianças com PC muitas vezes está associada à pobre postura de sentar durante a alimentação (Santos et al., 2012). A instabilidade postural, caracterizada por assimetrias corporais severas, afeta a habilidade da criança com PC em se alimentar, limitando sua capacidade de ingerir de forma segura os nutrientes necessários (Weir et al., 2013). Associado a isso, a postura individual na alimentação tem um impacto na mastigação e na deglutição dos alimentos por promover um pobre alinhamento ou reduzir a estabilidade corporal em detrimento de movimentos orais controlados (Weir et al., 2013).

Além do mais, alterações nas habilidades cognitivas, linguagem expressiva e receptiva, comunicação social e distúrbios comportamentais, dificultam a capacidade do indivíduo com PC interagir socialmente, contribuindo para o pobre estado nutricional (Andrew, Parr, Sullivan, 2013). As falhas na capacidade de comunicação dificulta a criança com PC em relatar suas preferências alimentares, bem como seu estado de fome e saciedade (Reilly, Skuse, 1992). Tais comprometimentos levam essas crianças a ter aversão ao período dedicado às refeições (Sullivan et al., 2000).

Em virtude da criança com PC apresentar diversos comprometimentos, o período da refeição costuma ser encarado como um desafio (Johnson, Deitz, 1985). Em média, essas crianças gastam entre 60 e 120 minutos durante as refeições, sendo um momento estressante para a criança e os cuidadores (Sangermano et al., 2014). É comum os cuidadores não saberem como dar um suporte apropriado para a criança durante a alimentação, promovendo práticas inadequadas e abusivas o que leva ainda mais dificuldades para criança (Black, 1999; Hurley et al. 2008).

Diante disso, estas dificuldades podem resultar em reduzida ingestão dietética, tempo de alimentação prolongado e pobre estado nutricional com consequente comprometimento na sua saúde geral (Calis et al., 2010).

Dessa forma, observa-se que as alterações nutricionais e a paralisia cerebral acarretam severos comprometimentos morfológicos e fisiológicos das diferentes habilidades sensório-motoras dos mamíferos, em particular nas estruturas e funções do sistema estomatognático. Contudo, pouco se sabe sobre como fatores nutricionais, sobretudo a desnutrição proteica perinatal, pode exacerbar o impacto nas funções orofaciais na paralisia cerebral. Diante disso, existem alguns mecanismos, sobretudo aqueles relacionados ao controle sensório-motor da mastigação que devem ser esclarecidos a fim minimizar os agravos relacionados ao quadro clínico e auxiliar na reabilitação dos indivíduos acometidos pela paralisia cerebral.

4. OBJETIVOS

4.1- Objetivo Geral:

Avaliar em modelo experimental de PC (Restrição sensório-motora associada à anóxia perinatal) em ratos, submetidos ou não à desnutrição perinatal, o controle sensório-motor da mastigação.

4.2- Objetivos Específicos:

Avaliar, em modelo experimental de Paralisia Cerebral sobre ratos submetidos ou não à desnutrição proteica:

- O ganho de peso corporal dos filhotes aos 8,14,17,21 e 29 dias de vida pós-natal;
- A Ingestão de leite materno aos 7,8,14,15,19 e 20 dias de vida pós-natal (consumo alimentar a partir da sucção);
- O consumo pós-desmame e sua relação pelo tempo gasto na alimentação aos 21 dias de vida pós-natal (consumo alimentar a partir da mastigação);
- Os parâmetros motores da função mastigatória (duração do período de incisão, duração do período da mastigação rítmica, número de ciclos mastigatórios e frequência mastigatória) aos 21 dias de vida pós-natal;
- A sensibilidade intra-oral (duração e quantidade das reações de “gosto) aos 21 dias de vida pós-natal;
- O peso muscular, o peso relativo e a distribuição dos tipos de fibras do feixe superficial do músculo masseter e do ventre anterior do músculo digástrico aos 29 dias de vida pós-natal.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi de caráter experimental com animais, realizado no laboratório de Fisiologia da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde UFPE – Recife e no laboratório do CAV (Centro Acadêmico de Vitória) UFPE – Vitória de Santo Antão.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE/CCB, processo nº 23076.025165/2014-10 (Anexo A). O manejo e os cuidados com os animais seguiram as normas recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), de acordo com a lei 11.794 de 8 de Outubro de 2008, e com as normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

5.1- Manipulação dos animais:

Foram utilizados 88 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, provenientes de 10 ratas da colônia do Biotério de criação do Departamento de Nutrição. Os animais foram mantidos no Biotério de experimentação do Departamento de Nutrição da UFPE com temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas, alojados em gaiolas de polipropileno com dimensões 46 x 31 x 21 cm (CxLxA), com livre acesso à água e alimentação (Figura 4).



Figura 4: Acondicionamento dos animais no Biotério, sob condições padrões e com livre acesso à água e alimentação.

5.2- Escolha das ratas para acasalamento:

Para obtenção dos filhotes, foram utilizadas 10 ratas como progenitoras, e para escolha das ratas foram utilizados os seguintes critérios: 1) as ratas não poderiam ter parentesco familiar, 2) possuir idade entre 90 e 120 dias de vida, 3) apresentar peso entre 220 e 250 gramas e 4) serem primíparas. Estes cuidados foram adotados para minimizar possíveis influências genéticas e fisiológicas nos resultados (Zambrano, Bautista et al. 2006). Em seguida, foi realizado um mapeamento do ciclo estral das ratas, através de esfregaço vaginal, e no período estro as fêmeas foram postas para acasalar (Marcondes, Bianchi et al., 2002).

5.3- Manipulação da dieta das ratas e formação dos grupos experimentais:

Após a confirmação da gestação (G0), através da técnica de esfregaço vaginal (Marcondes, Bianchi et al., 2002), as fêmeas foram alojadas em gaiolas individuais e divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais, com base na manipulação dietética aplicada às ratas: Normonutrido (N, n=5) e Desnutrido (D, n=5). O grupo nutrido recebeu dieta normoprotéica com 17% de caseína enquanto que o grupo desnutrido recebeu dieta hipoprotéica com 8% de caseína (Reeves et al., 1993).

Tabela 1. Composição da dieta experimental para roedores, com diferentes teores de proteína.

Ingredientes	Quantidade*	
	8 %	17%
Caseína	94,12 g	200,00 g
Mix Vitamínico**	10,00 g	10,00 g
Mix Mineral***	35,00 g	35,00 g
Celulose	50,00 g	50,00 g
Bitartarato de Colina	2,50 g	2,50 g
DL-Metionina	3,00 g	3,00 g
Óleo de Soja	70,0 ml	70,0 ml
Amido de Milho	503,40g	503,40 g
Amido Dextrinizado	132,00 g	132,00 g
Sacarose	100,00 g	100,00 g
THBT (antioxidante de gordura)	0,014 g	0,014 g

*Quantidade para 1 kg de dieta. Fonte: REEVES et al., 1993.

** Conteúdo da mistura mineral (mg/kg de dieta): CaHPO₄, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₂, 120; FeSO₄·7H₂O, 200; elementos traços, 400 (MnSO₄·H₂O, 98;

CuSO₄·5H₂O, 20; ZnSO₄·7H₂O, 80; CoSO₄·7H₂O, 0.16; KI, 0.32; amido suficiente par 40 g [per kg of diet]).

***Conteúdo da mistura de Vitaminas (mg/kg de dieta): retinol, 12; colecalciferol, 0.125; tiamina, 40; riboflavina, 30; ácido pantotênico, 140; piridoxina, 20; inositol, 300; cianocobalamina, 0.1; menadiona, 80; ácido nicotínico, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; p-ácido aminobenzóico, 100; biotina, 0.6.

Logo após o nascimento (P0), os neonatos foram selecionados aleatoriamente em ninhadas de oito filhotes por mãe. Em casos de ninhadas com mais de oito animais, foi dado preferência aos filhotes machos. Os filhotes fêmeas foram utilizados para padronização das ninhadas, em casos de proles contendo menos de oito filhotes machos. Apenas os filhotes machos foram submetidos aos experimentos e obtenção de resultados.

5.4- Formação dos grupos experimentais e desenho de estudo

Os filhotes foram distribuídos em quatro grupos, baseado na indução da paralisia cerebral experimental: grupo Normonutrido Controle (NC, n= 15), Normonutrido Anoxia Perinatal e Restrição Sensório-Motora(N-AP-RS, n=15); Desnutrido Controle (DC, n=15) e Desnutrido Anoxia Perinatal e Restrição Sensório-Motora (D-AP-RS, n=15). As ninhadas foram subdivididas de forma que quatro animais pertenciam ao grupo controle e os outros quatro pertenciam ao grupo submetido a paralisia cerebral experimental, totalizando oito animais por ninhada. Os filhotes permaneceram com suas respectivas mães até o fim do período de lactação (P21). A partir do vigésimo segundo dia de vida pós-natal (P22), os animais foram separados de suas respectivas genitoras e mantidos em gaiolas com três a quatro animais advindos da mesma ninhada e do mesmo grupo experimental. A manipulação da dieta foi mantida até os 29 dias de vida pós-nata. Nesse último dia (P29), os animais foram

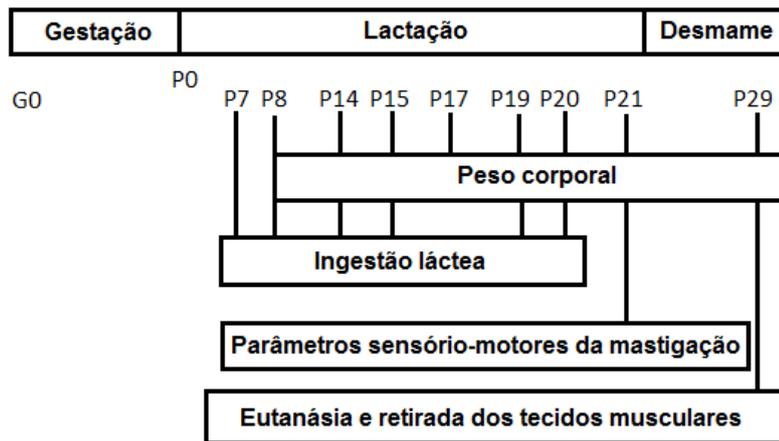


Figura 5: Fluxograma do desenho de estudo, destacando a ordem cronológica das etapas realizadas no estudo.

eutanasiados através da decapitação para retirada de tecidos para posterior análise histológica (Figura 5).

5.5- Modelo experimental de paralisia cerebral:

O modelo experimental de paralisia cerebral baseou-se nos experimentos de Strata et al. (2004), Coq et al. (2008) e Marcuzzo et al. (2008). Este modelo associa a anóxia perinatal a um modelo de restrição sensório-motora dos membros posteriores semelhante à falta de movimento ocorrida na PC.

Os animais selecionados aos grupos Normonutrido – PC (n=15) e Desnutrido – PC (n=15) foram submetidos a dois episódios de anóxia pós-natal, no dia do nascimento (P0) e no primeiro dia de vida pós-natal (P1). Os filhotes foram colocados dentro de uma câmara de anóxia hermeticamente fechada (Figura 6 e 7C), com dimensões de 16x16x12 cm (CxLxA) parcialmente imersa em água a 37 graus. A câmara foi acoplada a cilindro de gás nitrogênio (100%) (Linde; Figura 7A) a 9L/min por 12 minutos em cada dia. Após o período de anóxia, os animais foram retirados da câmara e colocados em temperatura ambiente. Após a recuperação de sua coloração rosada e respiração normal, os filhotes foram devolvidos para as suas respectivas ninhadas.



Figura 6 e 7: Câmara utilizada para realização da anóxia (figura 6). Materiais utilizados durante a anóxia: . A. Cilindro de Nitrogênio; B. Câmara de anóxia; C. Banho-maria (figura 7).

Após os dois episódios de anóxia, do segundo dia de vida (P2) ao vigésimo oitavo dia de vida pós natal (P28), os animais foram submetidos a restrição sensório motora das patas posteriores. A imobilização foi mantida 16 horas por dia (das 20h às 12h do dia seguinte), estando o animal livre para se movimentar nas 8 horas restantes (das 12h às 20h).

Para a restrição sensório-motora das patas posteriores, foi utilizado uma órtese moldada com massa de epóxi, mantida na região do quadril do animal, estando o mesmo com as patas posteriores estendidas. Para manutenção dessa posição, foram utilizados fitas micropore e esparadrapo. A colocação da órtese permitiu apenas movimentos limitados da articulação do quadril.

De modo a causar o mínimo de ferimentos possível, foi tido o cuidado de fixar o esparadrapo sobreposto a fita micropore, em virtude da mesma ser menos agressiva para o animal. Além disso, a colocação da ortese não prejudicava a eliminação de urina e fezes, bem como dos cuidados maternos (Strata et al., 2004).

Durante a retirada da órtese e fitas adesivas, alguns cuidados foram tomados, afim de provocar o mínimo dano possível aos animais: 1) Uso de tesoura pequena e cotonete embebido com álcool para facilitar a retirada do esparadrapo e fita micropore fixados à órtese, 2) Após retirada da órtese e fitas adesivas, um cotonete embebido em merthiolate foi utilizado nos locais onde apresentavam pequenas feridas, com propósito de facilitar cicatrização e reduzir o risco de infecções, 3) Em

alguns animais, foi necessário realizar limpeza de fezes presentes nas patas posteriores, com um auxílio de algodão encharcado com água.

Após o desmame dos filhotes, no vigésimo segundo dia de vida pós-natal (P22), fragmentos de *pellets* de caseína foram colocados no interior das gaiolas, com o objetivo de facilitar o alcance e aquisição do alimento. Tal cuidado foi tido sobretudo pela dificuldade dos animais submetidos à paralisia cerebral experimental em alcançar o alimento ofertado na grade da gaiola.

5.6- Análise do Peso Corporal:

O peso corporal das gestantes foi verificado a cada três dias durante toda a gestação e também durante o período de lactação até o desmame dos filhotes. O peso corporal dos filhotes foi verificado ao nascer, no 8º, 14º, 17º, 21º e 29º dia de vida pós-natal, para acompanhamento da taxa de crescimento desses animais. A pesagem dos animais foi feita a partir de uma balança eletrônica digital (Marte, modelo S-1000, capacidade de 1 Kg e sensibilidade de 0,1g)

5.7- Ingestão de leite materno:

Animais com 7, 8, 14, 15, 19 e 20 dias de vida pós-natal foram submetidos à avaliação da ingestão neonatal de leite segundo a adaptação do protocolo descrito por Perillan *et al.* (2007). O protocolo consistiu em quatro etapas: A) Privação: Os filhotes foram separados da mãe durante duas horas e alocados em caixas acrílicas com maravalha sob aquecimento com auxílio de uma lâmpada de 25-W. A temperatura cutânea foi monitorada através de um termistor e mantida a 33°C. B) Pesagem: Os neonatos foram pesados com auxílio de uma balança de precisão (Marte, modelo AUW220) antes e depois da privação. C) Ingestão: Os neonatos foram realocados junto as suas progenitoras durante uma hora e posteriormente repesados. D) Cálculo da ingestão: Após o final do teste, a ingestão de leite foi calculada pelo resultado da subtração do peso corporal obtido depois da observação comportamental pelo peso obtido anteriormente ao início desta. Para obtenção do peso corporal pré-observação, foi realizada estimulação genital para promover a excreção de urina e fezes (Hall *et al.*, 1977). Esta consistiu de fricção de objeto macio sobre a região genital dos filhotes até o término da excreção. Esse

procedimento garante maior confiabilidade à quantificação do consumo alimentar. De modo a evitar que a eventual competição entre animais do grupo controle e paralisia cerebral prejudicasse a obtenção dos resultados, a avaliação do consumo de leite foi feita separando esses animais. Por apresentar deficiências físicas, animais do grupo paralisia cerebral sofreriam desvantagens se avaliados junto com animais do grupo controle.

5.8- Análise dos parâmetros motores da mastigação:

Os animais foram submetidos à análise dos parâmetros motores da função mastigatória aos 21 dias de vida pós-natal de acordo com o protocolo de Ferraz-Pereira e colaboradores. Os animais foram submetidos a um jejum por um período de 3 hrs (das 15h às 18h) de privação alimentar. O início do jejum foi realizado individualmente com o intervalo de meia hora entre cada animal, afim de manter o mesmo tempo de jejum para todos os animais. Após o período de privação alimentar às 18hrs, os animais foram alocados individualmente em uma gaiola de acrílico transparente e filmados durante 15 minutos. Para filmagem, foi utilizado uma câmera (Sony DCR-DVD610 NTSC). No início da avaliação, foram colocados dentro da gaiola 1 grama de pequenos fragmentos de pellets de caseína para cada animal e posteriormente foi pesada a ração após o teste. A ingestão alimentar foi obtida pela diferença do peso da ração antes e após a observação comportamental (Berridge, 2014). Cada vídeo foi dividido em três partes de 5 minutos cada, e em cada parte foram extraídos cinco sequências mastigatórias. A escolha dessas sequências mastigatórias foi baseada na observação do momento em que o animal realizou os movimentos mastigatórios de forma contínua. Além disso, também foi levado em consideração, a qualidade de imagem da filmagem observada no plano sagital. Por meio da análise das sequências mastigatórias, os seguintes parâmetros foram avaliados: duração do período de incisão (período inicial caracterizado por sucessivas incisões), duração do período de mastigação rítmica (período subsequente marcado pela execução dos ciclos mastigatórios), número de ciclos mastigatórios (quantidade de movimentos verticais de abertura e fechamento da mandíbula) e frequência mastigatória (quantidade de ciclos mastigatórios realizados por segundo). Para quantificação de tais parâmetros, os vídeos foram analisados por um avaliador cego para a identidade do animal, e vistos em *slow-motion*, (redução

de 90% da velocidade), utilizando o programa *Media Player Classic Home Cinema* (versão 1.7.5).

5.9- Análise da sensibilidade intra-oral:

Animais com 21 dias de idade pós-natal foram submetidos à análise da sensibilidade intra-oral. No dia da avaliação, os animais passaram por um período de meia hora de adaptação ao local onde foi realizado o teste. Em seguida os animais foram alocados individualmente em uma gaiola, e filmados por baixo de um piso transparente. O teste consiste na administração de uma solução de sacarose (1%, 1ml, em 2 minutos e meio), na boca do animal, por meio de uma seringa de 1ml acoplado a uma cânula de gavagem. A Solução de sacarose (1%, 1ml) provoca as seguintes reações hedônicas positivas ou de "gosto": protrusões rítmicas da língua e lamber as patas. Movimentos rítmicos da boca, foram considerados reações neutras, não sendo avaliadas ao final do teste. Os vídeos foram analisados por um avaliador cego para a identidade dos animais para mensuração da duração e quantidade de reações de "gosto" realizadas por cada animal. Para cada reação foi estabelecido um tempo específico para sua quantificação, garantindo que cada reação contribuísse de forma equivalente. Para contabilização das protusões da língua foi definido como tempo dois segundos e o lamber as patas, em cinco segundos. A análise dos vídeos foi feita em *slow-motion*, (redução de 90% da velocidade), utilizando o programa *Media Player Classic Home Cinema* (versão 1.7.5). (Adaptado de Berridge., 2014).

5.10- Coleta dos músculos da mastigação:

No 29º dia pós-natal, os animais foram eutanasiados por decaptação. Após a eutanásia, foi feita uma incisão longitudinal anterior na região cervical, sendo os feixes superficial do músculo masseter do lado direito e esquerdo e o ventre anterior do músculo digástrico dissecados (Figura 8), fixados em N-Hexano e em seguida pesados. A massa de cada músculo (MM, em gramas) foi mensurada com auxílio de uma balança. Após a pesagem, os músculos masseter e digástrico dos diferentes grupos experimentais foram imediatamente congelados em isopentano (pré-esfriado

em dióxido de carbono solidificado a $-78,5^{\circ}\text{C}$), armazenados a -80°C e usados para análise da distribuição dos tipos de fibras musculares.

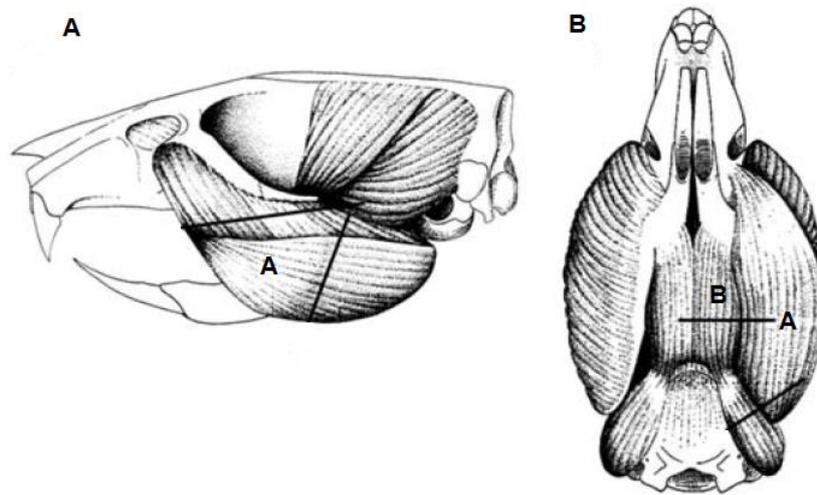


Figura 8: Vista lateral (figura 8 A) e anterior (figura 8 B), do feixe superficial do músculo masseter (A) e ventre anterior do músculo digástrico (B). Imagens retiradas do artigo “*Heterogeneity of Fiber Characteristics in the Rat Masseter and Digastric Muscles*”, 2007.

5.11- Análise histoquímica:

Secções transversais ($10\mu\text{m}$) foram cortadas com um criostato mantido a -20°C . Os cortes foram fixados em lâminas e ao atingirem a temperatura ambiente foi iniciada a coloração²⁸. Para obtenção de coloração característica da atividade ATPasica da miosina, foi utilizado o método proposto por Brooke e Kaiser (1970). Essa técnica estabelece que reações físico-químicas bem precisas, realizadas em várias etapas, permitem obter uma coloração característica da atividade enzimática específica. Dessa forma, foi possível identificar os diferentes tipos de fibras musculares encontrados nos cortes histológicos. Os cortes transversais do músculo serão corados em ATPase miofibrilar cálcio-ativada (mATPase), após pré-incubação em diferentes níveis de pH. As fibras musculares serão classificadas de acordo com a intensidade de reação à ATPase após a pré-incubação em meio ácido (pH 4,7), nos três tipos principais: I (fibras lentas oxidativas), IIa (fibras rápidas oxidativas-glicolítica) e IIb (fibras rápidas glicolíticas). (Cobos et al., 2001). Todas as fibras do feixe superficial do músculo masseter e do ventre anterior do músculo digástrico foram contadas em cada corte histológico e os valores referentes aos diferentes tipos de fibras foram expressos em percentual do número total. Os campos

microscópicos foram obtidos através de microscópio óptico OLYMPUS modelo U-CMAD-2 (objetiva 40 X) acoplado a um programa para captação de imagens. Para contagem das células foi utilizado o software MENSURIN PRO versão 3.2 (Jean-François Madre-Amiens, França).

5.12- Medidas de desfecho e definição das variáveis:

5.12.1- Variáveis independentes:

5.12.1.1- De Interesse: estado nutricional dos animais (normonutrido e desnutrido) e paralisia cerebral experimental.

Obs: Essas variáveis foram utilizadas para a composição dos grupos experimentais.

5.12.1.2- De Controle: idade e peso das gestantes e sexo dos filhotes.

5.12.2- Variáveis dependentes

4.12.2.1- Desfecho primário: O padrão sensório-motor da mastigação.

4.12.2.2- Desfechos secundários:

- O peso corporal dos filhotes;
- A Ingestão de leite;
- Os Parâmetros motores da função mastigatória (duração do período de incisão; duração do período de mastigação rítmica, número de ciclos mastigatórios e frequência mastigatória)
- Consumo alimentar pós-desmame e a relação do consumo pelo tempo da alimentação;
- A sensibilidade intra-oral (duração e quantidade de reações de “gosto”);
- O peso muscular e o peso relativo do feixe superficial do músculo masseter e ventre anterior do músculo digástrico aos 29 dias de vida pós-natal;
- A distribuição dos tipos de fibras e da morfologia do feixe superficial do músculo masseter e do ventre anterior do músculo digástrico aos 29 dias de vida pós-natal.

5.13 Análise estatística

Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados. Após a confirmação da distribuição normal foram feitas as análises estatísticas.

Para os dados de peso corporal e ingestão láctea foi feita uma análise de variância Two-Way com comparações múltiplas (Two-Way Repeated Measures). Para analisar os parâmetros motores da função mastigatória, consumo alimentar, a relação do consumo alimentar pelo tempo, duração e quantidade das reações de gosto, peso muscular e relativo e distribuição dos tipos de fibras dos músculos masseter e digástrico, foi realizado o teste ANOVA Two-Way.

O teste Post Hoc utilizado em todas as análises foi o teste de Bonferroni. Os valores estão expressos em Média e Erro Padrão da Média (EPM). Todas as variáveis foram representadas por gráfico de colunas, exceto o tempo e a duração das reações de gosto (sensibilidade intra-oral), que foi representada por tabela. A significância estatística foi considerada com nível crítico de 5% em todos os casos. Os dados foram analisados através do software SigmaStart[®] versão 3.5 e os gráficos feitos no Prisma[®] 6.0.

6. RESULTADOS

Esta pesquisa resultou em um artigo de revisão sistemática (ver APÊNDICE A) e um artigo original (ver APÊNDICE B). Os títulos dos trabalhos são descritos abaixo:

REVISÃO SISTEMÁTICA: Funções orofaciais avaliadas em modelos experimentais de paralisia cerebral: Uma revisão sistemática.

- Revista a ser submetida: **Journal of Oral Rehabilitation**
- Qualis da revista: **A2**

ARTIGO ORIGINAL: Modelo experimental de paralisia cerebral causa déficits no padrão sensório-motor da mastigação em ratos.

- Revista a ser submetida: **Physiology and Behavior**
- Qualis da revista: **A1**

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A indução da paralisia cerebral experimental provocou um impacto sobre o ganho de peso corporal, a capacidade de alimentação (consumo do leite materno e alimentos sólidos), a percepção do sabor doce e por fim comprometeu os parâmetros motores da função mastigatória.

Nosso estudo também investigou como a desnutrição perinatal, cenário típico de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, pode interferir sobre os aspectos morfológicos e funcionais da mastigação. Diante dos dados obtidos, foi verificado que a desnutrição proteica perinatal acentuou os prejuízos em funções sensoriais e motoras da mastigação em modelo experimental de paralisia cerebral.

Para esclarecer a redução na duração e quantidade nas respostas positivas provocadas pelo sabor doce, sugere-se que estudos posteriores avaliem os possíveis efeitos da paralisia cerebral sobre os receptores intra-orais, destinados a captar os estímulos gustativos. Nesse contexto, a avaliação morfológica das papilas gustativas situadas na superfície da língua, poderia elucidar os mecanismos envolvidos na instalação desses déficits sensoriais.

De acordo com os achados do presente estudo, um dos mecanismos subjacentes que justificam a instalação das sequelas nas funções mastigatórias, foi ocasionado por mudanças em propriedades musculares, sobretudo o declínio do peso muscular, bem como alterações na distribuição dos tipos de fibras dos músculos masseter e digástrico.

Para estudos posteriores, é importante também não só investigar as alterações secundárias musculoesqueléticas, como também entender quais são os mecanismos neurológicos primários relacionados a paralisia cerebral. Diante desse conhecimento, será possível estudar estratégias de tratamento que foquem no curso da plasticidade neural, afim de se obter melhorias efetivas no estado de saúde e qualidade de vida de crianças com paralisia cerebral.

REFERÊNCIAS

- ANDREW, M. J.; PARR, J. R.; SULLIVAN, P. B. Feeding difficulties in children with cerebral palsy. **Arch Dis Child Educ Pract Ed**, 97, 6, 222-229, Dec, 2012.
- ANDREW, M. J.; SULLIVAN, P. B. Growth in cerebral palsy. **Nutr Clin Pract**, 25, 4, 357-361, Aug, 2010.
- ARVEDSON, J. C. Feeding children with cerebral palsy and swallowing difficulties. **Eur J Clin Nutr**, 67 Suppl 2, S9-12, Dec, 2013.
- BALASUBRAMANIAM, J.; XUE, M.; BUIST, R. J.; IVANCO, T. L.; NATUIK, S.; DEL BIGIO, M. R. Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. **Exp Neurol**, 197, 1, 122-132, Jan, 2006.
- BADONNEL, K.; LACROIX, M. C.; MONNERIE, R.; DURIEUX, D.; CAILLOL, M.; BALY, C. Chronic restricted access to food leading to undernutrition affects rat neuroendocrine status and olfactory-driven behaviors. **Horm Behav**, 62, 2, 120-127, Jul, 2012.
- BARKER, D. J. Deprivation in infancy and risk of ischaemic heart disease. **Lancet**, 337, 8747, 981, Apr 20, 1991.
- BAX, M.; GOLDSTEIN, M.; ROSENBAUM, P.; LEVITON, A.; PANETH, N.; DAN, B.; JACOBSSON, B.; DAMIANO, D.; EXECUTIVE COMMITTEE FOR THE DEFINITION OF CEREBRAL, P. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. **Dev Med Child Neurol**, 47, 8, 571-576, Aug, 2005.
- BEDI, K. S.; BIRZGALIS, A. R.; MAHON, M.; SMART, J. L.; WAREHAM, A. C. Early life undernutrition in rats. 1. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refeed adult animals. **Br J Nutr**, 47, 3, 417-431, May, 1982.
- BENFER, K. A.; WEIR, K. A.; BELL, K. L.; WARE, R. S.; DAVIES, P. S.; BOYD, R. N. Longitudinal cohort protocol study of oropharyngeal dysphagia: relationships to gross motor attainment, growth and nutritional status in preschool children with cerebral palsy. **BMJ Open**, 2, 4, 2012.
- BENFER, K. A.; WEIR, K. A.; BELL, K. L.; WARE, R. S.; DAVIES, P. S.; BOYD, R. N. Oropharyngeal dysphagia in preschool children with cerebral palsy: oral phase impairments. **Res Dev Disabil**, 35, 12, 3469-3481, Dec, 2014.
- BLACK, M. M. Commentary: feeding problems: an ecological perspective. **J Pediatr Psychol**, 24, 3, 217-219, Jun, 1999.
- BOTTINELLI, R.; SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. **J Physiol**, 437, 655-672, Jun, 1991.

- BREDMAN, J. J.; WEIJS, W. A.; KORFAGE, H. A.; BRUGMAN, P.; MOORMAN, A. F. Myosin heavy chain expression in rabbit masseter muscle during postnatal development. **J Anat**, 180 (Pt 2), 263-274, Apr, 1992.
- BROCARD, F.; VERDIER, D.; ARSENAULT, I.; LUND, J. P.; KOLTA, A. Emergence of intrinsic bursting in trigeminal sensory neurons parallels the acquisition of mastication in weanling rats. **J Neurophysiol**, 96, 5, 2410-2424, Nov, 2006.
- BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Arch Neurol**, 23, 4, 369-379, Oct, 1970.
- BROOKS, J.; DAY, S.; SHAVELLE, R.; STRAUSS, D. Low weight, morbidity, and mortality in children with cerebral palsy: new clinical growth charts. **Pediatrics**, 128, 2, e299-307, Aug, 2011.
- CABANAC, M.; FANTINO, M. Origin of olfacto-gustatory alliesthesia: intestinal sensitivity to carbohydrate concentration? **Physiol Behav**, 18, 6, 1039-1045, Jun, 1977.
- CALIS, E. A.; VEUGELERS, R.; RIEKEN, R.; TIBBOEL, D.; EVENHUIS, H. M.; PENNING, C. Energy intake does not correlate with nutritional state in children with severe generalized cerebral palsy and intellectual disability. **Clin Nutr**, 29, 5, 617-621, Oct, 2010.
- CAMBRAIA, R. P.; VANNUCCHI, H.; ALMEIDA, S. S.; DE-OLIVEIRA, L. M. Effects of malnutrition during early lactation on development and feeding behavior under the self-selection paradigm. **Nutrition**, 17, 6, 455-461, Jun, 2001.
- CHEN, A.; DIMAMBRO, N.; CLOWRY, G. J. A comparison of behavioural and histological outcomes of periventricular injection of ibotenic acid in neonatal rats at postnatal days 5 and 7. **Brain Res**, 1201, 187-195, Mar 27, 2008.
- CHUA, C. O.; CHAHBOUNE, H.; BRAUN, A.; DUMMULA, K.; CHUA, C. E.; YU, J.; UNGVARI, Z.; SHERBANY, A. A.; HYDER, F.; BALLABH, P. Consequences of intraventricular hemorrhage in a rabbit pup model. **Stroke**, 40, 10, 3369-3377, Oct, 2009.
- COLVER, A.; FAIRHURST, C.; PHAROAH, P. O. Cerebral palsy. **Lancet**, 383, 9924, 1240-1249, Apr 5, 2014.
- COQ, J. O.; STRATA, F.; RUSSIER, M.; SAFADI, F. F.; MERZENICH, M. M.; BYL, N. N.; BARBE, M. F. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. **Exp Neurol**, 210, 1, 95-108, Mar, 2008.
- DE JERSEY, M. C. An approach to the problems of orofacial dysfunction in the adult. **Aust J Physiother**, 21, 1, 5-10, Mar, 1975.

- DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; PASSOS, M. C. Neonatal programming of neuroimmunomodulation--role of adipocytokines and neuropeptides. **Neuroimmunomodulation**, 15, 3, 176-188, 2008.
- DERRICK, M.; DROBYSHEVSKY, A.; JI, X.; TAN, S. A model of cerebral palsy from fetal hypoxia-ischemia. **Stroke**, 38, 2 Suppl, 731-735, Feb, 2007.
- DERRICK, M.; LUO, N. L.; BREGMAN, J. C.; JILLING, T.; JI, X.; FISHER, K.; GLADSON, C. L.; BEARDSLEY, D. J.; MURDOCH, G.; BACK, S. A.; TAN, S. Preterm fetal hypoxia-ischemia causes hypertonia and motor deficits in the neonatal rabbit: a model for human cerebral palsy? **J Neurosci**, 24, 1, 24-34, Jan 7, 2004.
- DROBYSHEVSKY, A.; YU, L.; YANG, Y.; KHALID, S.; LUO, K.; JIANG, R.; JI, H.; DERRICK, M.; KAY, L.; SILVERMAN, R. B.; TAN, S. Antenatal insults modify newborn olfactory function by nitric oxide produced from neuronal nitric oxide synthase. **Exp Neurol**, 237, 2, 427-434, Oct, 2012.
- DUPONT, E.; CANU, M. H.; FALEMPIN, M. A 14-day period of hindpaw sensory deprivation enhances the responsiveness of rat cortical neurons. **Neuroscience**, 121, 2, 433-439, 2003.
- EDVINSSON, S. E.; LUNDQVIST, L. O. Prevalence of orofacial dysfunction in cerebral palsy and its association with gross motor function and manual ability. **Dev Med Child Neurol**, Sep 10, 2015.
- FERRAZ-PEREIRA, K. N.; DA SILVA ARAGAO, R.; VERDIER, D.; TOSCANO, A. E.; LACERDA, D. C.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; KOLTA, A. Neonatal low-protein diet reduces the masticatory efficiency in rats. **Br J Nutr**, 114, 9, 1515-1530, Nov 14, 2015.
- FORBES, W. B.; TRACY, C.; RESNICK, O.; MORGANE, P. J. Effects of maternal dietary protein restriction on growth of the brain and body in the rat. **Brain Res Bull**, 2, 2, 131-135, Mar-Apr, 1977.
- GALLER, J. R.; RAMSEY, F.; SOLIMANO, G. A follow-up study of the effects of early malnutrition on subsequent development. I. Physical growth and sexual maturation during adolescence. **Pediatr Res**, 19, 6, 518-523, Jun, 1985.
- GISEL, E. G. Effect of oral sensorimotor treatment on measures of growth and efficiency of eating in the moderately eating-impaired child with cerebral palsy. **Dysphagia**, 11, 1, 48-58, Winter, 1996.
- GLADSTONE, M. A review of the incidence and prevalence, types and aetiology of childhood cerebral palsy in resource-poor settings. **Ann Trop Paediatr**, 30, 3, 181-196, 2010.
- GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BEEDLE, A. S. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. **Am J Hum Biol**, 19, 1, 1-19, Jan-Feb, 2007.

- GRILL, H. J.; NORGRÉN, R. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. **Brain Res**, 143, 2, 263-279, Mar 24, 1978.
- HALES, C. N.; BARKER, D. J.; CLARK, P. M.; COX, L. J.; FALL, C.; OSMOND, C.; WINTER, P. D. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **BMJ**, 303, 6809, 1019-1022, Oct 26, 1991.
- HALLAL, P. C.; DUMITH, S. C.; EKELUND, U.; REICHERT, F. F.; MENEZES, A. M.; VICTORA, C. G.; WELLS, J. C. Infancy and childhood growth and physical activity in adolescence: prospective birth cohort study from Brazil. **Int J Behav Nutr Phys Act**, 9, 82, 2012.
- HALLAL, P. C.; WELLS, J. C.; REICHERT, F. F.; ANSEMI, L.; VICTORA, C. G. Early determinants of physical activity in adolescence: prospective birth cohort study. **BMJ**, 332, 7548, 1002-1007, Apr 29, 2006.
- HIMMELMANN, K. Epidemiology of cerebral palsy. **Handb Clin Neurol**, 111, 163-167, 2013.
- HIMMELMANN, K.; BECKUNG, E.; HAGBERG, G.; UVEBRANT, P. Gross and fine motor function and accompanying impairments in cerebral palsy. **Dev Med Child Neurol**, 48, 6, 417-423, Jun, 2006.
- HOOIJMANS, C. R.; LEENAARS, M.; RITSKES-HOITINGA, M. A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the Three Rs, and to make systematic reviews more feasible. **Altern Lab Anim**, 38, 2, 167-182, May, 2010.
- HO, C. Y.; BERRIDGE, K. C. Excessive disgust caused by brain lesions or temporary inactivations: mapping hotspots of the nucleus accumbens and ventral pallidum. **Eur J Neurosci**, 40, 10, 3556-3572, Nov, 2014.
- HURLEY, K. M.; BLACK, M. M.; PAPAS, M. A.; CAULFIELD, L. E. Maternal symptoms of stress, depression, and anxiety are related to nonresponsive feeding styles in a statewide sample of WIC participants. **J Nutr**, 138, 4, 799-805, Apr, 2008.
- INGLIS, F. M.; ZUCKERMAN, K. E.; KALB, R. G. Experience-dependent development of spinal motor neurons. **Neuron**, 26, 2, 299-305, May, 2000.
- ITO, J.; ARAKI, A.; TANAKA, H.; TASAKI, T.; CHO, K.; YAMAZAKI, R. Muscle histopathology in spastic cerebral palsy. **Brain Dev**, 18, 4, 299-303, Jul-Aug, 1996.
- JIANG, T.; SOUSSIGNAN, R.; RIGAUD, D.; MARTIN, S.; ROYET, J. P.; BRONDEL, L.; SCHAAL, B. Alliesthesia to food cues: heterogeneity across stimuli and sensory modalities. **Physiol Behav**, 95, 3, 464-470, Oct 20, 2008.

- JOHNSON, C. B.; DEITZ, J. C. Time use of mothers with preschool children: a pilot study. **Am J Occup Ther**, 39, 9, 578-583, Sep, 1985.
- JOHNSTON, M. V.; FERRIERO, D. M.; VANNUCCI, S. J.; HAGBERG, H. Models of cerebral palsy: which ones are best? **J Child Neurol**, 20, 12, 984-987, Dec, 2005.
- JONES, M. W.; MORGAN, E.; SHELTON, J. E.; THOROGOOD, C. Cerebral palsy: introduction and diagnosis (part I). **J Pediatr Health Care**, 21, 3, 146-152, May-Jun, 2007.
- KANNAN, S.; SAADANI-MAKKI, F.; BALAKRISHNAN, B.; CHAKRABORTY, P.; JANISSE, J.; LU, X.; MUZIK, O.; ROMERO, R.; CHUGANI, D. C. Magnitude of [(11)C]PK11195 binding is related to severity of motor deficits in a rabbit model of cerebral palsy induced by intrauterine endotoxin exposure. **Dev Neurosci**, 33, 3-4, 231-240, 2011.
- KAWAI, N.; SANO, R.; KORFAGE, J. A.; NAKAMURA, S.; TANAKA, E.; VAN WESSEL, T.; LANGENBACH, G. E.; TANNE, K. Functional characteristics of the rat jaw muscles: daily muscle activity and fiber type composition. **J Anat**, 215, 6, 656-662, Dec, 2009.
- KHAN, N. Z.; FERDOUS, S.; MUNIR, S.; HUQ, S.; MCCONACHIE, H. Mortality of urban and rural young children with cerebral palsy in Bangladesh. **Dev Med Child Neurol**, 40, 11, 749-753, Nov, 1998.
- KOMAN, L. A.; SMITH, B. P.; SHILT, J. S. Cerebral palsy. **Lancet**, 363, 9421, 1619-1631, May 15, 2004.
- KORFAGE, J. A.; VAN EIJDEN, T. M. Myosin heavy chain composition in human masticatory muscles by immunohistochemistry and gel electrophoresis. **J Histochem Cytochem**, 51, 1, 113-119, Jan, 2003.
- KRICK, J.; MURPHY-MILLER, P.; ZEGER, S.; WRIGHT, E. Pattern of growth in children with cerebral palsy. **J Am Diet Assoc**, 96, 7, 680-685, Jul, 1996.
- KRIGGER, K. W. Cerebral palsy: an overview. **Am Fam Physician**, 73, 1, 91-100, Jan 1, 2006.
- KUBAN, K. C.; LEVITON, A. Cerebral palsy. **N Engl J Med**, 330, 3, 188-195, Jan 20, 1994.
- KUPERMINE, M. N.; STEVENSON, R. D. Growth and nutrition disorders in children with cerebral palsy. **Dev Disabil Res Rev**, 14, 2, 137-146, 2008.
- LANGENBACH, G. E.; VAN WESSEL, T.; BRUGMAN, P.; KORFAGE, J. A.; VAN EIJDEN, T. M. Is fiber-type composition related to daily jaw muscle activity during postnatal development? **Cells Tissues Organs**, 187, 4, 307-315, 2008.

- LANGLET, C.; CANU, M. H.; FALEMPIN, M. Short-term reorganization of the rat somatosensory cortex following hypodynamia-hypokinesia. **Neurosci Lett**, 266, 2, 145-148, May 7, 1999.
- LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, 156, 38-50; discussion 50-35, 1991.
- LUCAS, A. Long-term programming effects of early nutrition -- implications for the preterm infant. **J Perinatol**, 25 Suppl 2, S2-6, May, 2005.
- LUNDBERG, A. Oxygen consumption in relation to work load in students with cerebral palsy. **J Appl Physiol**, 40, 6, 873-875, Jun, 1976.
- MANCINI, M. C.; FIUZA, P. M.; REBELO, J. M.; MAGALHAES, L. C.; COELHO, Z. A.; PAIXAO, M. L.; GONTIJO, A. P.; FONSECA, S. T. [Comparison of functional activity performance in normally developing children and children with cerebral palsy]. **Arq Neuropsiquiatr**, 60, 2-B, 446-452, Jun, 2002.
- MARBINI, A.; FERRARI, A.; CIONI, G.; BELLANOVA, M. F.; FUSCO, C.; GEMIGNANI, F. Immunohistochemical study of muscle biopsy in children with cerebral palsy. **Brain Dev**, 24, 2, 63-66, Mar, 2002.
- MARCUZZO, S.; DUTRA, M. F.; STIGGER, F.; DO NASCIMENTO, P. S.; ILHA, J.; KALIL-GASPAR, P. I.; ACHAVAL, M. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. **Brain Dev**, 32, 4, 323-331, Apr, 2010.
- MORGANE, P. J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DIAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J. R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, 17, 1, 91-128, Spring, 1993.
- MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev**, 26, 4, 471-483, Jun, 2002.
- MOSTAFEEZUR, R. M.; ZAKIR, H. M.; YAMADA, Y.; YAMAMURA, K.; IWATA, K.; SESSLE, B. J.; KITAGAWA, J. The effect of minocycline on the masticatory movements following the inferior alveolar nerve transection in freely moving rats. **Mol Pain**, 8, 27, 2012.
- NAKAJIMA, I.; OHNISHI, T.; NAGASAWA, A.; SEKI, M.; TAKANASHI, N.; TAKEI, K.; MAEDA, T.; OGURA, T.; AKASAKA, M. Relationship between the values of masticatory efficiency and biting pressure in children with cerebral palsy--inter-relationship between the maximum biting pressure, chewing cycle and the value of masticatory efficiency. **J Nihon Univ Sch Dent**, 30, 3, 244-260, Sep, 1988.
- NOVACHEK, T. F.; GAGE, J. R. Orthopedic management of spasticity in cerebral palsy. **Childs Nerv Syst**, 23, 9, 1015-1031, Sep, 2007.

- NOVAK, I.; HINES, M.; GOLDSMITH, S.; BARCLAY, R. Clinical prognostic messages from a systematic review on cerebral palsy. **Pediatrics**, 130, 5, e1285-1312, Nov, 2012.
- OLIVEIRA L.V.F. Da bancada ao leito: a partir de um diagnóstico preciso para o tratamento adequado. O uso crescente da pesquisa translacional. **ConScientiae Saúde** 2009;8:545-547
- OHARA, I.; TABUCHI, R.; KIMURA, M.; ITOKAWA, Y. Decline of taste sensitivity in protein deficient adult rats. **Physiol Behav**, 57, 5, 921-926, May, 1995.
- ORTEGA, A. O.; GUIMARAES, A. S.; CIAMPONI, A. L.; MARIE, S. K. Frequency of temporomandibular disorder signs in individuals with cerebral palsy. **J Oral Rehabil**, 35, 3, 191-195, Mar, 2008.
- OZANNE, S. E.; HALES, C. N. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. **Nature**, 427, 6973, 411-412, Jan 29, 2004.
- PARADA S; OLIVEIRA, F; PACHECO, ME; ALVES, PHM; LIBERTI, EA Effects of protein malnutrition on muscle fibers of the brachial biceps and medial pterygoid of Wistar rats. **J. Morphol. Sci.**, 2011, vol. 28, no. 3, p. 196-203
- PARKES, J.; HILL, N.; PLATT, M. J.; DONNELLY, C. Oromotor dysfunction and communication impairments in children with cerebral palsy: a register study. **Dev Med Child Neurol**, 52, 12, 1113-1119, Dec, 2010.
- PERILLAN, C.; COSTALES, M.; VIJANDE, M.; ARGUELLES, J. In utero extracellular dehydration modifies thirst in neonatal rats. **Appetite**, 51, 3, 599-603, Nov, 2008.
- REDDIHOUGH, D. S.; BAIKIE, G.; WALSTAB, J. E. Cerebral palsy in Victoria, Australia: mortality and causes of death. **J Paediatr Child Health**, 37, 2, 183-186, Apr, 2001.
- REDSTONE, F.; WEST, J. F. The importance of postural control for feeding. **Pediatr Nurs**, 30, 2, 97-100, Mar-Apr, 2004
- PRAKASH, Y. S.; FOURNIER, M.; SIECK, G. C. Effects of prenatal undernutrition on developing rat diaphragm. **J Appl Physiol (1985)**, 75, 3, 1044-1052, Sep, 1993.
- REID, S. M.; MCCUTCHEON, J.; REDDIHOUGH, D. S.; JOHNSON, H. Prevalence and predictors of drooling in 7- to 14-year-old children with cerebral palsy: a population study. **Dev Med Child Neurol**, 54, 11, 1032-1036, Nov, 2012.
- REILLY, S.; SKUSE, D. Characteristics and management of feeding problems of young children with cerebral palsy. **Dev Med Child Neurol**, 34, 5, 379-388, May, 1992.

- REILLY, S.; SKUSE, D.; POBLETE, X. Prevalence of feeding problems and oral motor dysfunction in children with cerebral palsy: a community survey. **J Pediatr**, 129, 6, 877-882, Dec, 1996.
- RODRIGUES DOS SANTOS, M. T.; MASIERO, D.; NOVO, N. F.; SIMIONATO, M. R. Oral conditions in children with cerebral palsy. **J Dent Child (Chic)**, 70, 1, 40-46, Jan-Apr, 2003.
- ROSENBAUM, P.; PANETH, N.; LEVITON, A.; GOLDSTEIN, M.; BAX, M.; DAMIANO, D.; DAN, B.; JACOBSSON, B. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. **Dev Med Child Neurol Suppl**, 109, 8-14, Feb, 2007.
- SAADANI-MAKKI, F.; KANNAN, S.; LU, X.; JANISSE, J.; DAWE, E.; EDWIN, S.; ROMERO, R.; CHUGANI, D. Intrauterine administration of endotoxin leads to motor deficits in a rabbit model: a link between prenatal infection and cerebral palsy. **Am J Obstet Gynecol**, 199, 6, 651 e651-657, Dec, 2008.
- SANCHES, E. F.; ARTENI, N. S.; NICOLA, F.; BOISSERAND, L.; WILLBORN, S.; NETTO, C. A. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. **Neuroscience**, 237, 208-215, May 1, 2013.
- SANGERMANO, M.; D'ANIELLO, R.; MASSA, G.; ALBANO, R.; PISANO, P.; BUDETTA, M.; SCUCCIMARRA, G.; PAPA, E.; COPPOLA, G.; VAJRO, P. Nutritional problems in children with neuromotor disabilities: an Italian case series. **Ital J Pediatr**, 40, 61, 2014.
- SANTOS, M. T.; BATISTA, R.; PREVITALI, E.; ORTEGA, A.; NASCIMENTO, O.; JARDIM, J. Oral motor performance in spastic cerebral palsy individuals: are hydration and nutritional status associated? **J Oral Pathol Med**, 41, 2, 153-157, Feb, 2012.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. **Physiol Rev**, 76, 2, 371-423, Apr, 1996.
- SERDAROGLU, A.; CANSU, A.; OZKAN, S.; TEZCAN, S. Prevalence of cerebral palsy in Turkish children between the ages of 2 and 16 years. **Dev Med Child Neurol**, 48, 6, 413-416, Jun, 2006.
- SHIDA, T.; ABE, S.; SAKIYAMA, K.; AGEMATSU, H.; MITARASHI, S.; TAMATSU, Y.; IDE, Y. Superficial and deep layer muscle fibre properties of the mouse masseter before and after weaning. **Arch Oral Biol**, 50, 1, 65-71, Jan, 2005.
- SMOTHERMAN, W. P.; ROBINSON, S. R. Milk as the proximal mechanism for behavioral change in the newborn. **Acta Paediatr Suppl**, 397, 64-70, Jun, 1994.

- STALLINGS, V. A.; CHARNEY, E. B.; DAVIES, J. C.; CRONK, C. E. Nutritional status and growth of children with diplegic or hemiplegic cerebral palsy. **Dev Med Child Neurol**, 35, 11, 997-1006, Nov, 1993.
- STANLEY, F. J.; WATSON, L. Trends in perinatal mortality and cerebral palsy in Western Australia, 1967 to 1985. **BMJ**, 304, 6843, 1658-1663, Jun 27, 1992.
- STIGGER, F.; FELIZZOLA, A. L.; KRONBAUER, G. A.; COUTO, G. K.; ACHAVAL, M.; MARCUZZO, S. 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. **Exp Neurol**, 228, 2, 183-191, Apr, 2011.
- STRATA, F.; COQ, J. O.; BYL, N.; MERZENICH, M. M. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: implications for a rodent model of cerebral palsy. **Neuroscience**, 129, 1, 141-156, 2004.
- STRAUSS, D. J.; SHAVELLE, R. M.; ANDERSON, T. W. Life expectancy of children with cerebral palsy. **Pediatr Neurol**, 18, 2, 143-149, Feb, 1998.
- SULLIVAN, P. B. Nutrition and growth in children with cerebral palsy: setting the scene. **Eur J Clin Nutr**, 67 Suppl 2, S3-4, Dec, 2013.
- SULLIVAN, P. B.; LAMBERT, B.; ROSE, M.; FORD-ADAMS, M.; JOHNSON, A.; GRIFFITHS, P. Prevalence and severity of feeding and nutritional problems in children with neurological impairment: Oxford Feeding Study. **Dev Med Child Neurol**, 42, 10, 674-680, Oct, 2000.
- SUBRAMANIAN, K.N.S., Extremely low birth weight infant. <http://emedicine.medscape.com/article/979717-overview> (Accessed Sept 12, 2010). 2009.
- TAN, S.; DROBYSHEVSKY, A.; JILLING, T.; JI, X.; ULLMAN, L. M.; ENGLOF, I.; DERRICK, M. Model of cerebral palsy in the perinatal rabbit. **J Child Neurol**, 20, 12, 972-979, Dec, 2005.
- TOSCANO, A. E.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, 24, 3, 270-278, Mar, 2008.
- TOTH, M. J.; POEHLMAN, E. T. Energetic adaptation to chronic disease in the elderly. **Nutr Rev**, 58, 3 Pt 1, 61-66, Mar, 2000.
- VIK, T.; SKROVE, M. S.; DOLLNER, H.; HELLAND, G. [Feeding problems and growth disorders among children with cerebral palsy in south and north Trondelag]. **Tidsskr Nor Laegeforen**, 121, 13, 1570-1574, May 20, 2001.
- WEIR, K. A.; BELL, K. L.; CARISTO, F.; WARE, R. S.; DAVIES, P. S.; FAHEY, M.; RAWICKI, B.; BOYD, R. N. Reported eating ability of young children with

cerebral palsy: is there an association with gross motor function? **Arch Phys Med Rehabil**, 94, 3, 495-502, Mar, 2013.

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review). **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83, 5, 1388-1392, Mar, 1986.

WESTNEAT, M. W.; HALL, W. G. Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: an electromyographic analysis of suckling and chewing. **Behav Neurosci**, 106, 3, 539-554, Jun, 1992.

WYVELL, C. L.; BERRIDGE, K. C. Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement. **J Neurosci**, 20, 21, 8122-8130, Nov 1, 2000.

YAMADA, Y.; YAMAMURA, K.; INOUE, M. Coordination of cranial motoneurons during mastication. **Respir Physiol Neurobiol**, 147, 2-3, 177-189, Jul 28, 2005.

YEARGIN-ALLSOPP, M.; VAN NAARDEN BRAUN, K.; DOERNBERG, N. S.; BENEDICT, R. E.; KIRBY, R. S.; DURKIN, M. S. Prevalence of cerebral palsy in 8-year-old children in three areas of the United States in 2002: a multisite collaboration. **Pediatrics**, 121, 3, 547-554, Mar, 2008.

ZAMBRANO, E.; BAUTISTA, C. J.; DEAS, M.; MARTINEZ-SAMAYOA, P. M.; GONZALEZ-ZAMORANO, M.; LEDESMA, H.; MORALES, J.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P. W. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. **J Physiol**, 571, Pt 1, 221-230, Feb 15, 2006.

APÊNDICE A

Artigo de Revisão Sistemática

Este artigo será submetido para publicação na *Journal of Oral Rehabilitation* conceito A2 para a área 21 da CAPES.

FUNÇÕES OROFACIAIS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE PARALISIA CEREBRAL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

**Diego Cabral LACERDA^a, Kelli Nogueira FERRAZ-PEREIRA^b, André TERÁCIO^a,
Raul MANHÃES-DE-CASTRO^b, Ana Elisa TOSCANO^b**

^a Programa de Pós-graduação em Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco.

^b Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.

10 páginas de texto, 1 figura e 4 tabelas

*** Corresponding Author**

Diego Cabral Lacerda.

Rua Carlos Leite Moreira, N: 251, Casa Caiada.

Olinda – Pernambuco – Brasil. CEP 53130-470

Telefone: +55 81 997272443 / 343113904

E-mail: diego.clacerda@hotmail.com

**FUNÇÕES OROFACIAIS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE PARALISIA
CEREBRAL: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA
OROFACIAL FUNCTIONS ASSESSED IN EXPERIMENTAL MODEL OF
CEREBRAL PALSY: A SISTEMATIC OVERVIEW**

Diego Cabral Lacerda¹, Kelli Nogueira Ferraz-Pereira², André Terácio³, Raul Manhães-de-Castro, Ana
Elisa Toscano⁴

^{1,3}Mestrando em Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco

^{2,4}Doutora em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

O objetivo deste estudo é produzir revisão sistemática que reúna os possíveis efeitos sobre as funções orofaciais induzidos por modelos experimentais de paralisia cerebral em animais. Dois avaliadores independentes conduziram a revisão sistemática nas bases de dados eletrônicas MedLine, SCOPUS, Cinahl, Lilacs e Web of Science, usando os descritores do Mesh e Decs em modelos animais. Os parâmetros motores e sensoriais da sucção, mastigação e deglutição, foram considerados como desfecho primário e reatividade ao odor, controle da salivação, controle postural e mobilidade da cabeça durante a alimentação, e habilidade do animal em adquirir o alimento como desfechos secundários. A avaliação do risco de viés dos estudos foi realizada pelos componentes metodológicos descritos por Hooijmans e colaboradores (2010). 10 estudos foram selecionados. A maioria dos estudos utilizam coelhos como modelo experimental de paralisia cerebral. A indução da paralisia cerebral foi feita a partir da hipóxia-isquemia, inflamação ou hemorragia interventricular. Todos os modelos experimentais de paralisia cerebral analisados, modificam as funções orofaciais, observados em sua maioria nos modelos de hipóxia –isquemia. Contudo o modelo de inflamação foi mais eficaz em reproduzir danos de maior intensidade na coordenação da sucção e deglutição. Mais estudos devem ser realizados afim de esclarecer os mecanismos subjacentes aos danos orofaciais e otimizar as estratégias de tratamento oferecidas para crianças com PC.

Palavras chave : Paralisia cerebral. Modelos Experimentais. Comportamento Alimentar.

INTRODUÇÃO:

A paralisia cerebral (PC) é descrita como uma síndrome neurológica caracterizada por alterações no movimento, tônus muscular e postura corporal, resultante de um distúrbio não progressivo que ocorre no sistema nervoso central fetal ou da criança em desenvolvimento¹. Tais manifestações provocam limitações na atividade de vida diária da criança e dependência funcional². O dano pode ocorrer ainda no útero, durante o nascimento ou nos primeiros anos de vida³. A prevalência da PC é de 2 a 3.5 por 1000 nascidos vivos^{4,5}, onde a maioria dos casos, 70 a 80% são adquiridos durante o período pré-natal, seguido de infecções do sistema nervoso central durante o período pós-natal e complicações no trabalho de parto, como a asfixia neonatal^{6,7}.

Além dos comprometimentos primários relacionados a desordens no tônus, postura e movimento, crianças com PC usualmente apresentam comorbidades incluindo problemas com a salivação, sucção, mastigação e deglutição, genericamente denominados de disfunções orofaciais⁸⁻¹⁰. Esses problemas resultam em dificuldades na alimentação e pobre estado nutricional^{11,12}. Estima-se que 85% das crianças com PC apresentam dificuldades na alimentação¹³, 65% déficits nos movimentos mastigatórios e 40% apresentam disfunção no controle da saliva¹⁴.

Uma alimentação equilibrada é fundamental para manutenção da saúde e bem estar do indivíduo¹⁵. Entretanto, a precariedade na habilidade de se alimentar observada em crianças com PC provoca aumento do risco de mortalidade e está associado com pior prognóstico da desordem¹⁵. Notavelmente, as causas mais comuns de morte em crianças com PC são secundários a doenças respiratórias e disfunções orofaciais¹⁶. Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, mais de 90% das crianças com PC apresentam dificuldades na alimentação levando a moderada ou severa desnutrição^{17,18}. Há relatos que a desnutrição é a principal causa de morte de crianças com PC em alguns países subdesenvolvidos da África¹⁹.

A má nutrição em crianças com PC é frequentemente causada por comprometimentos nas funções orofaciais, nas quais prejudicam a habilidade da criança em consumir de forma segura as calorias e nutrientes necessários para o seu crescimento²⁰. Ademais, anormalidades nas estruturas anatômicas envolvidas com a preparação oral e no desenvolvimento do reflexo da deglutição, podem resultar em severa disfunção alimentar e inadequada ingestão nutricional^{20,21}. Essas anormalidades limitam o consumo alimentar em virtude da ausência do controle da

salivação, episódios de tosse, incoordenação dos músculos mandibulares, pobre controle da língua, atraso da deglutição, resultando num prolongado tempo de refeição e frustração da criança e dos pais^{22,23}.

A PC é considerada a causa mais comum de incapacidade física na infância²⁴ e estudos em animais tem fornecido grandes avanços e conhecimentos importantes sobre a patogênese da doença²⁵. Tais estudos vêm contribuindo na construção de potenciais terapias que visam minimizar a incapacidade crônica da desordem²⁶. Os modelos experimentais replicam uma ou mais características da PC nos animais em desenvolvimento. No entanto, existe uma significativa heterogeneidade nesses modelos. A variabilidade nos modelos desenvolvidos envolvem diferentes aspectos da doença, tais como o tempo, o mecanismo e a extensão da injúria, o uso de diferentes espécies e os parâmetros avaliados.

Quanto aos parâmetros avaliados em modelos experimentais, a maior parte dos estudos que utilizam modelos experimentais de PC, buscam investigar os mecanismos subjacentes aos achados neurológicos e modificações na atividade locomotora. Contudo, há uma escassez na literatura de estudos que investiguem os processos relacionados sobretudo ao comportamento alimentar e às funções orofaciais desses animais. Sendo assim, torna-se relevante avaliar o impacto de modelos experimentais de PC nas funções orofaciais, e avaliar quais são os comprometimentos provocados, e os mecanismos associados a essas manifestações. Diante do exposto, o objetivo deste estudo é produzir revisão sistemática que reúna os possíveis efeitos sobre as funções orofaciais induzidos por modelos experimentais de PC em animais.

MÉTODOS

Estratégia de busca

A pesquisa na literatura foi realizada em Abril de 2015 nas bases de dados eletrônicas MedLine/ Pubmed (National Library of Medicine/ Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), SCOPUS, Cinahl, Lilacs (Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde) e Web of Science. A pesquisa focou em estudos experimentais que utilizaram modelos experimentais de paralisia cerebral em animais que avaliaram os parâmetros das funções orofaciais, usando a

combinação dos descritores MESH “Animals”, “Models”, “Rats”, “Rabbits”, “Sheep”, “Cats”, “Primates”, “Piglets”, “Cerebral Palsy”, “Mouth”, “Behavior”, “Feeding Behavior”, “Smell”, “Mastication”, “Sucking Behavior”, “Deglutition”, “Olfaction disorders” e “Taste” ou seus respectivos descritores do DECS (Animais, Modelos, Ratos, Coelhos, Ovelhas, Gatos, Primatas, Porcos, Paralisia Cerebral, Boca, Comportamento, Comportamento Alimentar, Cheiro, Mastigação, Sucção, Deglutição, Desordens Olfatórias e Gosto). Não houve restrição do ano nem da língua de publicação dos artigos. Além disso, uma limitação foi estabelecida em apenas incluir artigos que usaram animais experimentais no estudo.

A pesquisa foi conduzida nas bases de dados eletrônicas por dois revisores independentes (Lacerda DC e Terácio A) baseado num protocolo pré-definido. Um terceiro avaliador (Ferraz KN) foi consultado quando necessário como um mediador para definição da inclusão ou não inclusão dos artigos que não houberam concordância entre os revisores. Por fim, a extração dos dados foi realizada de acordo com a avaliação dos critérios de elegibilidade definidos no estudo.

Critérios de inclusão

Para selecionar os artigos que entraram nesta revisão sistemática, os seguintes critérios de inclusão foram estabelecidos: a) Artigos de natureza experimental com animais b) Artigos que utilizaram indução de paralisia cerebral em animais durante o período de gestação ou nos primeiros dias de vida dos filhotes, c) Artigos que apresentaram grupo controle isento de intervenções, e, d) Artigos que avaliaram parâmetros das funções orofaciais.

Critérios de exclusão

Foram excluídos os artigos que não descreveram de forma detalhada e clara o método de indução de paralisia cerebral, o que impossibilitaria a replicação do modelo.

Avaliação dos artigos

A avaliação metodológica dos estudos e o risco de viés foram realizados por pontos específicos que interferiam na validade interna dos estudos experimentais,

de acordo com os pontos destacados por Hooijmans et. al. (2010)²⁸: alojamento, iluminação, temperatura, água, dieta e código de ética.

Sobre as características de base da amostra, o protocolo de indução da paralisia cerebral e a avaliação dos desfechos, foram considerados a espécie animal, o modelo de PC utilizado, o período de indução da PC e a idade da avaliação dos parâmetros da função orofacial.

Os desfechos primários verificados foram: parâmetros motores e sensoriais das funções orofaciais sucção, mastigação e deglutição. Como desfechos secundários têm-se sensibilidade ao odor; controle postural e mobilidade da cabeça durante a alimentação; habilidade do animal em adquirir o alimento; e, controle da salivação.

RESULTADOS:

A pesquisa inicial nas bases de dados feita pelos dois revisores mostraram 1174 artigos na Medline/Pubmed, 452 artigos na SCOPUS, 341 artigos na Cinahl, 7 artigos na Lilacs e 596 artigos na Web of Science. Após análise dos títulos e abstracts de todos os 2570 artigos encontrados, 2530 artigos foram excluídos por não contemplarem os pontos estabelecidos nos critérios de inclusão e/ou se enquadravam nos critérios de exclusão. Após completa avaliação dos 40 incluídos, 15 eram duplicados e 15 não preencheram os critérios de inclusão e/ou se enquadravam nos critérios de exclusão, finalizando então com 10 artigos, como apresentado na Figura 1.

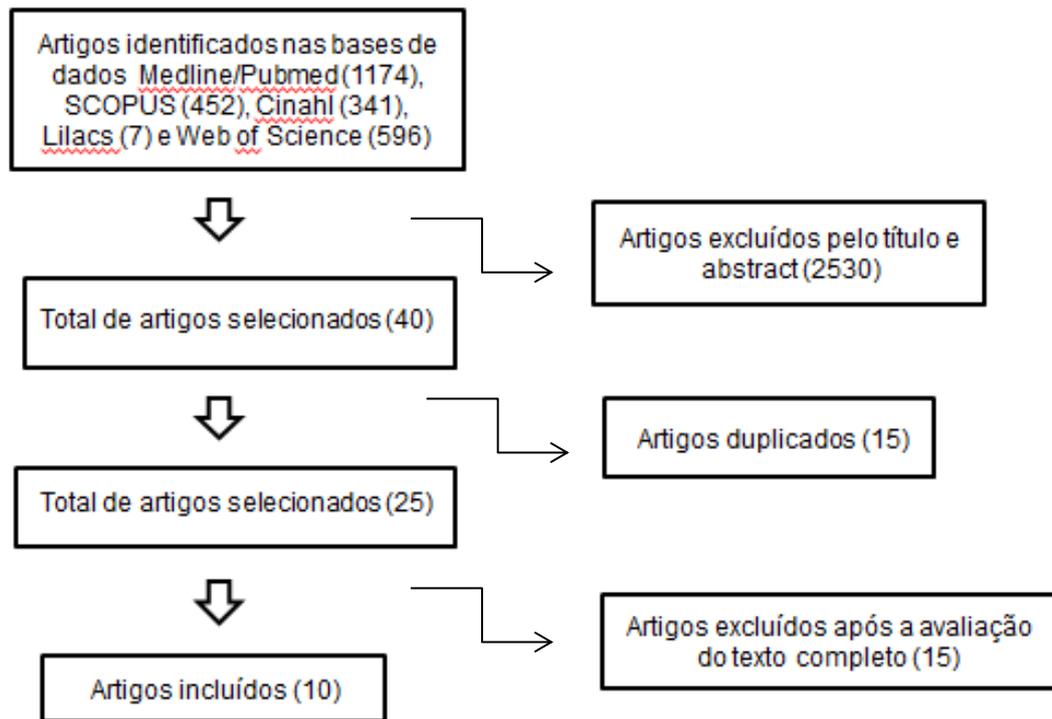


Fig. 1: Fluxograma das etapas de seleção dos artigos.

. Todos os estudos apresentaram déficits metodológicos, contemplando poucos itens da ferramenta. A tabela 1 demonstra a avaliação dos artigos de acordo com os pontos destacados por Hooijmans et. al. (2010). Dos dez artigos incluídos, um obteve 80%³⁶, ao passo que quatro obtiveram 60%^{29,31,32,34}, um obteve 40%³³, dois somaram 20%^{30,37} e dois obtiveram 0%^{35,38}.

As características das amostras, o protocolo do modelo de PC e os parâmetros avaliados nos estudos estão resumidos na tabela 2, 3 e 4. Dos 10 artigos avaliados foi observado que 03 (três) utilizaram a inflamação como modelo de indução de PC (Tabela 3); enquanto que 02 (dois) artigos realizaram a hemorragia interventricular (Tabela 4); e, 05 (cinco), a hipóxia-isquemia (Tabela 2). Destes artigos, além da variabilidade quanto ao modelo de indução de paralisia cerebral utilizado, houve heterogeneidade também segundo a espécie utilizada, o período de indução da PC, alguns parâmetros e idade de avaliação. Diante da variedade, os resultados foram apresentados de acordo com os achados de cada modelo de indução.

Dos 03 (três) artigos que utilizaram como modelo de indução da PC a inflamação, 02 (dois) realizaram a administração de LPS, em coelho, no período

gestacional (G8). Ao passo que, 01 (um) autor induziu a PC por meio da administração do IBA, em rato (Wistar), no período pós-natal (P5 ou P7) (Tabela 3). Quanto aos desfechos verificados, a administração do LPS promoveu a incoordenação da sucção e deglutição e redução dos movimentos da cabeça durante a alimentação em coelhos ao P1. Enquanto que, a administração do IBA, avaliada a partir do P28, levou ao dano no alcance e aquisição do alimento (Tabela 3).

No que concerne aos estudos que fizeram uso da hemorragia interventricular para indução da PC, 01 (um) artigo realizou a administração do glicerol, em coelho, no período neonatal (2 horas de vida). Enquanto que, 01 (um) estudo fez uso da infusão de sangue autólogo, em rato, no período neonatal (24 a 36 hs no P1) (Tabela 4). A administração do glicerol não promoveu danos ao P14. Em contrapartida, a infusão de sangue autólogo acarretou dano no alcance e aquisição do alimento em ratos ao P70 (Tabela 4).

E, por fim, dos 05 (cinco) artigos que utilizaram como modelo de indução da PC a hipóxia-isquemia, todos foram realizados em coelho e as avaliações dos parâmetros das funções orofaciais foram realizadas com P1. Contudo, no presente modelo, foi observado variabilidade quanto ao período de indução da hipóxia-isquemia, apesar de todos terem ocorrido durante o período gestacional. Assim, 01 (um) artigo realizou a indução durante o período gestacional intermediário (G21, 22 e 25) e final (G28 e G29); 01 (um), no período gestacional G21 e 22 ou G29; 01 (um), no período gestacional G21 e 22; e, 02 (dois), no período gestacional G22 (Tabela 2). Quanto aos desfechos verificados, a hipóxia-isquemia promoveu incoordenação da sucção e deglutição, comprometimento da resposta aversiva olfatória e redução dos movimentos da cabeça durante a alimentação ao P1 (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Revisões sistemáticas de estudos experimentais têm fornecido informações relevantes na compreensão dos mecanismos subjacentes envolvidos nas doenças. Esses dados podem auxiliar a comunidade científica na tomada de decisões baseadas em evidências nos cuidados da saúde. Nesse contexto, essa revisão sistemática teve como objetivo reunir os estudos que avaliaram o impacto nas

funções orofaciais provocados a partir da indução de PC em animais. A síntese e análise dos dados colhidos, em especial aqueles relacionados ao controle das funções orofaciais sucção, mastigação e deglutição, possibilitaria esclarecer os mecanismos associados a essas manifestações. Contudo, a transição dos achados para prática clínica deve ser realizada com atenção.

Os artigos apresentam heterogeneidades relacionadas ao modelo de PC, à espécie animal avaliada, o período de indução da PC, e a idade de avaliação, o que inviabiliza a aplicação da meta-análise. Entre os modelos experimentais, observa-se que os que se baseiam na hipóxia-isquemia materna parecem padronizados, visto que em todos os estudos houve variabilidade somente quanto ao período de indução da hipóxia-isquemia. Contudo, apesar disso, todos os artigos induzem a hipóxia-isquemia durante a gestação, havendo mudança somente com relação ao período gestacional (inicial, intermediário ou final). Além do mais, os modelos de hipóxia-isquemia são eficazes na reprodução de diversos parâmetros orofaciais, apesar de apresentar altas taxas de mortalidade (41, 42 e 50%).

Os estudos avaliados demonstraram que os modelos experimentais de indução da PC foram capazes de reproduzir as características e os danos da PC. O modelo de PC utilizado nos diferentes estudos apresentados mimetiza os quadros de PC espástica. As desordens motoras observadas em indivíduos com PC espástica pode afetar a fala, deglutição e respiração (4). Os padrões clínicos de envolvimento descritos na PC espástica inclui a diplegia (envolvimento das pernas com leve efeito nos braços), hemiplegia (envolvimento da perna e braço ipsilateral), e quadriplegia (envolvimento de todos os quatro membros) (5).

Dentre os desfechos relatados nos estudos temos a incoordenação da sucção e deglutição; redução dos movimentos da cabeça durante a alimentação; comprometimento da resposta aversiva olfatória; e, dano no alcance e aquisição do alimento. Todas as alterações supracitadas, com exceção do dano no alcance e aquisição do alimento, foram observadas nos modelos de hipóxia-isquemia. Os modelos de indução da inflamação promoveram danos de maior intensidade na incoordenação da sucção e deglutição, bem como a redução dos movimentos da cabeça durante a alimentação e o dano no alcance e aquisição do alimento. Enquanto que, a hemorragia interventricular causou dano no alcance e aquisição do alimento.

Como um dos objetivos do presente artigo, foi avaliar os efeitos do modelo experimental de paralisia cerebral sobre parâmetros motores e sensoriais da mastigação, como as funções orofaciais sucção, mastigação e deglutição. Os modelos de PC que utilizaram inflamação por LPS e de hipóxia-isquemia promoveram a incoordenação da sucção e deglutição. Entretanto, não há relatos na literatura científica sobre o impacto da paralisia cerebral experimental na função mastigatória.

Os modelos de hipóxia-isquemia ou inflamação materna promovem incoordenação da sucção e deglutição, sendo evidenciada pela regurgitação nasal do leite até incapacidade de reter o leite dentro da cavidade oral, além da perda de todo conteúdo por gotejamento. Em humanos, observa-se que esses danos na coordenação da sucção, respiração e deglutição²³ leva a aspirações recorrentes do bolo alimentar para o interior das vias aéreas e conseqüentemente infecções do tórax e problemas pulmonares^{39,40}. A dificuldade para reter o bolo alimentar ou fluido no interior da cavidade oral contribui para o pobre estado nutricional e desidratação^{22,23,41}.

O atraso ou ausência da mobilidade da cabeça frente ao estímulo de oferta de leite no canto da boca foi observado nos animais que sofreram hipoxia-isquemia ou inflamação materna. Em crianças é frequente o déficit nos movimentos da cabeça, pescoço, tronco e membros superiores, durante a alimentação⁴² bem como redução do reflexo de sucção⁴³. Para o funcionamento oral eficaz durante a alimentação é necessário a estabilidade da cabeça para melhor controle da mandíbula⁴⁴. O controle de cabeça é influenciado pelo alinhamento do tronco⁴⁴. Portanto, esses déficits nos movimentos corporais resultam em reduzida ingestão dietética, tempo de alimentação prolongado e pobre estado nutricional⁴⁵.

Além disso, os estudos revelam que animais com paralisia cerebral subsequente à inflamação pós-natal ou hemorragia interventricular apresentaram dificuldades em utilizar as patas dianteiras para alcançar e manipular o alimento com aptidão, deixando cair com frequência. Crianças com PC comumente são incapazes de manter e manipular o alimento sobre a língua, deixando cair da boca²². Também assimetrias corporais severas associado a pobre postura de sentar durante a alimentação são observadas em crianças com paralisia cerebral⁴³. Essas anormalidades dificultam o uso coordenado das mãos para conduzir o alimento a boca⁴⁶, levando a uma ingestão inadequada de nutrientes⁴⁶. Em suma, a

precariedade das funções orofaciais correlaciona-se com o aumento das limitações nas funções motoras grossas bem como aumento das limitações nas habilidades manuais⁴⁷. Todavia, não foi encontrado nenhum estudo na literatura que abordassem o controle postural durante alimentação e controle da salivação, bem como do consumo alimentar.

Esses danos motores podem estar associados as modificações no sistema nervoso dos animais em virtude da paralisia cerebral. A maioria dos estudos revela a ativação das micróglia em diversos segmentos do encéfalo, sobretudo na substância branca (corpo caloso, região periventricular, cápsula interna e coroa radiada)^{29,30,32,33}. As micróglia ativadas promovem injúria neuronal e de oligodendrócitos, uma vez que ocorre a hipomielinização e perda neuronal em áreas nobres do sistema nervoso central^{29,33}. Também é observado aumento no número e hipertrofia dos astrócitos em múltiplas áreas da substância branca, sobretudo na zona periventricular^{30,34,36}. Esses achados prejudicam a irrigação sanguínea e a disponibilidade de oxigênio e glicose no tecido nervoso⁴⁸.

Somada as alterações no sistema nervoso ocorrem importantes alterações no sistema muscular. Em animais com paralisia cerebral foi observado aumento do tônus (espasticidade) dos músculos das patas anteriores e posteriores associado à anormalidades posturais, déficits de endireitamento, alterações na marcha e redução da atividade locomotora^{29,31,32,33,34,35}. A intensidade, qualidade e duração dos movimentos da cabeça, patas anteriores e patas posteriores foram reduzidas nesses animais²⁷. Os artigos observaram que o aumento do tônus muscular se relaciona com a injúria na substância branca, observada em regiões como na cápsula interna e coroa radiada^{33,35}. Fadoua Saadani e colaboradores²⁹ sugerem que o aumento do tônus muscular observado em animais PC é explicado pela ativação de micróglia, sobretudo na substancia branca encefálica. Esses déficits motores prejudicam a postura e mobilidade necessária para a adequada função oral.

No que concerne as desordens nas funções orofaciais musculares foi observado em animais submetidos a indução de PC, alterações nos reflexos de sucção e deglutição^{29,31,32,33,35}. Em crianças com PC ocorre anormalidades na maturação das funções orofaciais musculares⁴⁸, hipertonia dos músculos que fecham a mandíbula⁴⁹, redução da força de mordida durante a ingestão alimentar⁵⁰, fraca sucção⁴³, redução do vedamento labial⁴², pobre controle dos lábios e língua⁴² e

redução da motilidade faríngea⁴². Essas modificações nos músculos orofaciais contribuíram para a incoodenação da sucção e deglutição.

A ausência ou atraso da resposta aversiva provocada por estimulação olfatória foi observada nos modelos de hipóxia-isquemia durante o período de gestação. Mathew Derrick e colaboradores³² observaram degeneração extensa do córtex piriforme, induzida por hipóxia-isquemia no período gestacional. O córtex piriforme é considerado a principal região que integra e transmite as informações olfatórias para o bulbo olfatório^{37,38}. Sugere-se que a injúria nessa região pode explicar a ausência ou retardo na resposta olfatória aversiva em animais submetidos a privação de oxigênio. No entanto mais estudos experimentais são necessários para investigar outros mecanismos que explicariam a base desses achados comportamentais e motores.

CONCLUSÃO

Todos os modelos experimentais de PC analisados modificam as funções orofaciais em diferentes espécies e períodos da vida do animal. Os modelos de hipóxia –isquemia provocam modificações nas funções orofaciais sensoriais e motoras na maioria dos parâmetros analisados. Contudo o modelo de hemorragia interventricular foi mais eficaz em reproduzir danos de maior intensidade na coordenação da sucção e deglutição. Estudos que investiguem os mecanismos subjacentes aos danos orofaciais, devem ser realizados afim de otimizar as estratégias de tratamento oferecidas para crianças com PC e minimizar os danos orofaciais inerentes a essa desordem.

REFERÊNCIAS

- 1- Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl* 2007; **109**: 8–14.
- 2- Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P, Leviton A, Paneth N, Dan B, Jacobsson B, Damasio D. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Dev Med Child Neurol*. 2005; 47: 571-6.
- 3- Koman LA, Smith BP, Shilt JS. Cerebral palsy. *Lancet*. 2004; 363: 1619-31.

- 4- Yeargin-Allsopp M, Van Naarden Braun K, Doernberg NS, Benedict RE, Kirby RS, Durkin MS. Prevalence of cerebral palsy in 8-year-old children in three areas of the United States in 2002: a multisite collaboration. *Pediatrics* 2008; **121**: 547–54.
- 5- Stanley FJ, Watson L. Trends in perinatal mortality and cerebral palsy in Western Australia, 1967 to 1985. *BMJ* 1992; **304**: 1658–63.
- 6- Krigger KW. Cerebral palsy: an overview. *Am Fam Physician*. 2006; 73:91-100.
- 7- Gladstone M. A review of the incidence and prevalence, types and aetiology of childhood cerebral palsy in resource-poor settings. *Ann Trop Paediatr* 2010; 30: 181–96.
- 8- Krick J, Murphy-Miller P, Zeger S, Wright E. Pattern of growth in children with cerebral palsy. *J Am Diet Assoc*. 1996; 96: 680 – 685.
- 9- Novak I, Hines M, Goldsmith S, Barclay R. Clinical prognostic messages from a systematic review on cerebral palsy. *Pediatrics* 2012; 130: e1285–312.
- 10- De Jersey MC. An approach to the problems of orofacial dysfunction in the adult. *Aust J Physiother* 1975; 21: 5–10.
- 11-Brooks J, Day S, Shavelle R, Strauss D. Low weight, morbidity, and mortality in children with cerebral palsy: new clinical growth charts. *Pediatrics* 2011; 128: e299–307.
- 12-Stallings VA, Charney EB, Davies JC, Cronk CE. Nutritional status and growth of children with diplegic or hemiplegic cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 1993; 35: 997–1006.
- 13-Reid SM, McCutcheon J, Reddihough DS, Johnson H. Prevalence and predictors of drooling in 7- to 14-yearold children with cerebral palsy: a population study. *Dev Med Child Neurol* 2012; 54: 1032–6.
- 14-Parkes J, Hill N, Platt MJ, Donnelly C. Oromotor dysfunction and communication impairments in children with cerebral palsy: a register study. *Dev Med Child Neurol* 2010; 52: 1113–9.
- 15- Strauss DJ, Shavelle RM, Anderson TW. Life Expectancy of Children With Cerebral Palsy. *Pediatr Neurol*. 1998;18: 143 - 149.
- 16-Westbom L, Bergstrand L, Wagner P, Nordmark E. Survival at 19 years of age in a total population of children and young people with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2011; 53: 808–14.

- 17-Reilly, S., Skuse, D. & Poblete, X. Prevalence of feeding problems and oral motor dysfunction in children with cerebral palsy: a community survey. *Journal of Pediatrics* 1996, 129, 877–882.
- 18-Sullivan, P. B. & Rosenbloom, L. *Feeding the Disabled Child* 1996. Mac Keith Press (Cambridge University Press), UK.
- 19-Khan, N. Z., Ferdous, S., Munir, S., Huq, S. & McConachie, H. Mortality of urban and rural young children with cerebral palsy in Bangladesh. *Developmental Medicine and Child Neurology* 1998, 40,749–753.
- 20-Stallings VA, Charney EB, Davies JC, Cronk CE. Nutritional status and growth of children with diplegic or hemiplegic cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 1993; 35: 997–1006.
- 21- Sullivan, P. B., Juszczak, E., Lambert, B. R., Rose, M., Ford-Adams, M.E. & Johnson, A Impact of feeding problems on nutritional intake and growth: Oxford Feeding Study II. *Developmental Medicine and Child Neurology* 2002, 44, 461–467.
- 22-Gisel EG, Patrick J. Identification of children with cerebral palsy unable to maintain a normal nutrition state. *Lancet* 1988; 1: 283-286
- 23-Santos MT, Batista R, Previtali E, Ortega A, Nascimento O, Jardim J. Oral motor performance in spastic cerebral palsy individuals: are hydration and nutritional status associated? *J Oral Pathol Med* 2012; 41: 153–157.
- 24- Kuban KC, Leviton A. Cerebral palsy. *N Engl J Med* 1994; 330: 188–95.
- 25- Johnston V, Ferriero M, Vannucci J, Hagberg H. Models of Cerebral Palsy: Which Ones Are Best?. *J Child Neurol* 2005 20: 984.
- 26- Oliveira L.V.F. Da bancada ao leito: a partir de um diagnóstico preciso para o tratamento adequado. O uso crescente da pesquisa translacional. *ConScientiae Saúde* 2009;8:545-547.
- 27- Hooijmans C.R., Leenaars M., Ritskes-Hoitinga, M. A gold standard publication checklist to improve the quality of animal studies, to fully integrate the three Rs, and to make systematic reviews more feasible. *ATLA* 2010;38:167–182
- 28-Saadani-Makki F, Kannan S, Lu X, et al. Intrauterine administration of endotoxin leads to motor deficits in a rabbit model: a link between prenatal infection and cerebral palsy. *Am J Obstet Gynecol* 2008;199-651.

- 29-Chen A, Dimambro N, Clowry J. A comparison of behavioural and histological outcomes of periventricular injection of ibotenic acid in neonatal rats at postnatal days 5 and 7. *Brain Research* 2008.
- 30-Sidhartha Tan MD, Alexander Drobyshevsky PhD, Tamas Jilling MD, Xinhai Ji MD, Lauren M. Ullman BS, Ila Englof BS, Matthew Derrick MBBS. Model of Cerebral Palsy in the Perinatal Rabbit. *J Child Neurol* 2005;20:972–979.
- 31-Matthew Derrick, Ning Ling Luo, Joanne C. Bregman, Tamas Jilling, Xinhai Ji, Kara Fisher, Candace L. Gladson, Douglas J. Beardsley, Geoffrey Murdoch, Stephen A. Back, Sidhartha Tan. *The Journal of Neuroscience*, January 7, 2004 • 24(1):24–34.
- 32-Kannan S, Saadani-Makki F, Balakrishnan B, Chakraborty P, Janisse J, Lu X, Muzik O, Romero R, Chugani DC. Magnitude of [11 C]PK11195 Binding Is Related to Severity of Motor Deficits in a Rabbit Model of Cerebral Palsy Induced by Intrauterine Endotoxin Exposure. *Dev Neurosci* 2011;33:231–240.
- 33-Caroline O. Chua, MD; Halima Chahboune, PhD; Alex Braun, MD; Krishna Dummula, MD; Charles Edrick Chua; Jen Yu, MA; Zoltan Ungvari, MD, PhD; Ariel A. Sherbany, MD; Fahmeed Hyder, PhD; Praveen Ballabh, MD. Consequences of Intraventricular Hemorrhage in a Rabbit Pup Model. *Stroke*. 2009;40:3369-3377.
- 34-Matthew Derrick, MBBS; Alexander Drobyshevsky, PhD; Xinhai Ji, MD; Sidhartha Tan, MD. A Model of Cerebral Palsy From Fetal Hypoxia-Ischemia. *Stroke*. 2007;38[part 2]:731-735.
- 35-Janani Balasubramaniam, Mengzhou Xue, Richard J. Buist, Tammy L. Ivanco, Shannon Natuik, Marc R. Del Bigio. Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. *Experimental Neurology* 197 (2006) 122 – 132.
- 36-Alexander Drobyshevsky, Lei Yu, Yirong Yang, Syed Khalid, Kehuan Luo, Rugang Jiang, Haitao Ji, Matthew Derrick, Leslie Kay, Richard B. Silverman, Sidhartha Tan. Antenatal insults modify newborn olfactory function by nitric oxide produced from neuronal nitric oxide synthase *Experimental Neurology* 237 (2012) 427–434.
- 37-Alexander Drobyshevsky, Alan M. Robinson, Matthew Derrick, Alice M. Wyrwicz, Xinhai Ji, Ila Englof, Sidhartha Tan. Sensory deficits and olfactory

- system injury detected by novel application of MEMRI in newborn rabbit after antenatal hypoxia–ischemia. *NeuroImage* 32 (2006) 1106–1112.
- 38-Reddihough, D. S., Baikie, G. & Walstab, J. E. (2001) Cerebral palsy in Victoria, Australia: mortality and causes of death. *Journal of Paediatrics and Child Health*, **37**, 183–186.
- 39-Reid SM, Carlin JB, Reddihough DS. Survival of individuals with cerebral palsy born in Victoria, Australia, between 1970 and 2004. *Dev Med Child Neurol* 2012; 53:53–60.
- 40-Brooks J, Day S, Shavelle R, Strauss D. Low weight, morbidity, and mortality in children with cerebral palsy: new clinical growth charts. *Pediatrics* 2011; 128: e299–307.
- 41- Santos M. T., Batista R., Previtali E., Ortega A., Nascimento O., Jardim J. Oral motor performance in spastic cerebral palsy individuals: are hydration and nutritional status associated? *J Oral Pathol Med* 41: 153–157, 2012.
- 42- Reilly S, Skuse D. Characteristics and Management of Feeding of Young Children with Cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol*. 1992; 34: 379-388.
- 43- Redstone F, West JF. The Importance of Postural Control for Feeding. *Pediatr Nurs*. 2004 Mar-Apr;30(2):97-100.
- 44-Calis EA, Veugelers R, Rieken R, Tibboel D, Evenhuis HM, Penning C. Energy intake does not correlate with nutritional state in children with severe generalized cerebral palsy and intellectual disability. *Clin Nutr*; 29: 617–21, 2010.
- 45-Weir K. A., Bell K. L., Caristo F., et al. Reported Eating Ability of Young Children With Cerebral Palsy: Is There an Association With Gross Motor Function? *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 94:495-502, 2013.
- 46-Benfer KA, Weir KA, Bell KL, Ware RS, Davies PS, Boyd RN. Oropharyngeal dysphagia and gross motor skills in children with cerebral palsy. *Pediatrics* 2013; 131: e1553–62.
- 47-Benfer KA, Weir KA, Bell KL, et al. Longitudinal cohort protocol study of oropharyngeal dysphagia: relationships to gross motor attainment, growth and nutritional status in preschool children with cerebral palsy. *BMJ Open*;001460, 2012.

- 48- Ortega O. L., Guimaraes A. S., Ciamponi A. L., Marie S. K. N. Frequency of temporomandibular disorder signs in individuals with cerebral palsy. *Journal of Oral Rehabilitation.* 35; 191–195, 2008.

Autor/ Ano	Alojamento	Luminosidade	Temperatura	Água/dieta	Código de ética
Fadoua Saadani et al., 2008²⁹	-	-	+	+	+
Aiqing Chen et al., 2008³⁰	-	-	-	-	+
Sidhartha Tan et al., 2005³¹	+	-	+	+	-
Mathew Derrick et al., 2004³²	+	-	+	-	+
Sujatha Kannan et al, 2011³³	+	-	-	-	+
Caroline O. Chua et al., 2015³⁴	-	-	+	+	+
Matthew Derrick et al., 2007³⁵	-	-	-	-	-
Janani Balasubramaniam et al., 2006³⁶	+	+	-	+	+
Alexander Drobyshevsky et al., 2012³⁷	-	-	-	-	+
Alexander Drobyshevsky et .,2006³⁸	-	-	-	-	-

Tabela 1: Condições de qualidade do biotério avaliadas pelos itens destacados por Hooijmans et al.,2010

Autor/ Ano	Animal (Espécie)	Modelo de PC	Período de indução	Idade da avaliação	Resultados
Sidhartha Tan et al., 2005³¹	Coelho	Hipóxia-isquemia	Período gestacional intermediário (G21, 22 e 25) e final (G28 e 29)	P1	1- Incoordenação da sucção e deglutição. 2-Comprometimento da resposta aversiva olfatória. 3- Redução dos movimentos da cabeça durante a alimentação.
Mathew Derrick et al., 2004³²	Coelho	Hipóxia-isquemia	Período gestacional (G21 e 22)	P1	1- Incoordenação da sucção e deglutição. 2-Redução dos movimentos da cabeça durante a alimentação.
Matthew Derrick et al., 2007³⁵	Coelho	Hipóxia-isquemia	Período gestacional (G21 e 22 ou G29)	P1	1- Incoordenação da sucção e deglutição. 2-Comprometimento da resposta aversiva olfatória.
Alexander Drobyshevsky et al., 2012³⁷	Coelho	Hipóxia-isquemia	Período gestacional (G22)	P1	1-Comprometimento da resposta aversiva olfatória.
Alexander Drobyshevsky et al.,2006³⁸	Coelho	Hipóxia-isquemia	Período gestacional (G22)	P1	1-Comprometimento da resposta aversiva olfatória.

Tabela 2: Caracterização da amostra e resultados encontrados em modelos de hipóxia-isquemia

Autor/ Ano	Animal (Espécie)	Modelo de PC	Período de indução	Idade da avaliação	Resultados
Fadoua Saadani et al., 2008²⁹	Coelho	Inflamação (administração do LPS)	Período gestacional (G28)	P1	1- Incoordenação da sucção e deglutição. 2-Redução dos movimentos da cabeça durante a alimentação.
Aiqing Chen et al., 2008³⁰	Rato (<i>Wistar</i>)	Inflamação (administração do IBA)	Período pós-natal (P5 ou P7)	A partir do P28	1-Dano no alcance e aquisição do alimento.
Sujatha Kannan et al, 2011³³	Coelho	Inflamação (administração do LPS)	Período gestacional (G28)	P1	1- Incoordenação da sucção e deglutição.

Tabela 3: Caracterização da amostra e resultados encontrados em modelos de inflamação

Autor/ Ano	Animal (Espécie)	Modelo de PC	Período de indução	Idade da avaliação	Resultados
Caroline O. Chua et al., 2015³⁴	Coelho	Hemorragia interventricular (administração do glicerol)	Período neonatal (2 horas de vida)	P14	1-Não foi observado nenhum dano.
Janani Balasubramaniam et al., 2006³⁶	Rato (Sprague dawley)	Hemorragia interventricular (infusão de sangue autólogo)	Período neonatal (24-36hrs no P1)	P70	1-Dano no alcance e aquisição do alimento.

Tabela 4: Caracterização da amostra e resultados encontrados em modelos de hemorragia interventricular

APÊNDICE B

Artigo Original:

Este artigo será submetido para publicação na *Physiology and Behavior* conceito A1 para a área 21 da CAPES.

MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL ASSOCIADO A DESNUTRIÇÃO PERINATAL CAUSA DÉFICITS NO PADRÃO SENSÓRIO MOTOR DA MASTIGAÇÃO EM RATOS

Diego Cabral LACERDA^a, Kelli Nogueira FERRAZ-PEREIRA^b, Kássia Oliveira Gomes da SILVA^a André TERÁCIO^a, Raul MANHÃES-DE-CASTRO^b, Ana Elisa TOSCANO^b

^a Programa de Pós-graduação em Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco.

^b Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco.

*** Corresponding Author**

Diego Cabral Lacerda.

Rua Carlos Leite Moreira, N: 251, Casa Caiada.

Olinda – Pernambuco – Brasil. CEP 53130-470

Telefone: +55 81 997272443 / 343113904

E-mail: diego.clacerda@hotmail.com

MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL ASSOCIADO A DESNUTRIÇÃO PERINATAL CAUSA DÉFICITS NO PADRÃO SENSÓRIO MOTOR DA MASTIGAÇÃO EM RATOS

RESUMO

Comumente, crianças com Paralisia Cerebral (PC) apresentam dificuldades na alimentação, resultante de múltiplas alterações orofaciais, incluindo prejuízos na mastigação. Associado a isso, o aporte nutricional durante as fases iniciais da vida parece desempenhar papel importante na maturação do sistema nervoso central e funções vitais em indivíduos com Paralisia Cerebral (PC). Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da desnutrição perinatal sobre o padrão sensório-motor da mastigação em ratos submetidos ao modelo experimental de PC. Foram utilizados 60 ratos machos da linhagem *Wistar*, distribuídos aleatoriamente nos grupos: grupo Normonutrido (NC, n=15), Normonutrido PC (NPC, n=15); Desnutrido (DC, n=15) e Desnutrido PC (DPC, n=15). Os animais do grupo PC foram submetidos a um modelo experimental baseado na combinação da anóxia perinatal associado à restrição sensório-motora das patas posteriores. Foram avaliados nos diferentes grupos: ganho de peso corporal, a ingestão de leite materno, o consumo alimentar pós-desmame, os parâmetros motores da função mastigatória, a sensibilidade intra-oral e propriedades musculares (peso muscular e relativo e a distribuição dos tipos de fibras) do músculo masseter e digástrico. Animais do grupo Desnutrido PC, apresentaram redução mais acentuada da maior parte dos parâmetros avaliados, incluindo o peso corporal ($P<0,05$), consumo alimentar pós-desmame ($P<0,05$), frequência mastigatória ($P<0,05$), duração das reações de “gosto” ($P<0,05$), peso muscular e declínio na proporção das fibras tipo IIB no músculo masseter ($P<0,05$). Esses resultados demonstraram em ratos paralíticos que a desnutrição perinatal prejudica parâmetros funcionais e morfológicos da mastigação, podendo afetar a digestão e absorção dos alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Paralisia Cerebral. Modelo Experimental. Desnutrição; Mastigação.

1. Introdução

A paralisia cerebral (PC) é considerada uma disfunção sensório-motora, resultante de uma lesão estática e não progressiva, que acomete o sistema nervoso central em desenvolvimento (Kriger , 2006; Mancini et al., 2002). Sua prevalência é cerca de 2 a 3,5 por 1000 nascidos vivos (Yeargin-Allsopp et., 2008), sendo a causa mais comum de incapacidade física na infância (Mancini et al., 2002). No entanto, em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, a prevalência é maior por apresentar condições mais favoráveis à ocorrência de problemas crônicos como a PC (Himmelmann, 2013). Nesses países, a PC está relacionada a precárias condições materno-infantis de nutrição (Himmelmann et al., 2006; Serdaroglu et al., 2006).

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que variações ambientais, a exemplo do aporte nutricional, durante a vida precoce podem levar às mudanças fenotípicas com repercussões permanentes na estrutura e função dos sistemas fisiológicos (Moura et al., 2008; Bento-Santos et al., 2012). Neste contexto, surge o conceito de plasticidade fenotípica, a qual consiste na capacidade de um organismo de reagir aos desafios impostos pelo ambiente, modificando a sua forma, estado, movimento ou padrão de atividade (West-Eberhard, 1986). A má-nutrição, sobretudo a desnutrição proteica, pode resultar em alterações nos eventos ontogenéticos do sistema nervoso central, incluindo prejuízos na mielinização, característico da PC (Forbes et al.,1977). Dessa forma, estudos revelam que o pobre estado nutricional parece exacerbar os efeitos primários da injúria cerebral em crianças com paralisia cerebral (Andrew, Sullivan, 2010).

O pobre estado nutricional, observado em crianças com distúrbios neurológicos, é resultante de dificuldades alimentares envolvidas na preparação oral do alimento, incluindo problemas com a salivação, sucção, mastigação e deglutição (Benfer et al., 2012). O atraso no desenvolvimento da função mastigatória, particularmente, reduz a coordenação dos movimentos da mandíbula e a força da mordida durante a ingestão alimentar (Benfer et al., 2014; Nakagima et al., 1988). Ademais, o dano no sistema piramidal observado na PC, pode dar origem a alterações no tônus muscular, e causar lesões nos padrões eferentes (motor), que, por sua vez, pode levar a hipertonia e afetar os músculos que elevam a mandíbula

(Ortega et al., 2008). Essas anormalidades parecem ser ocasionadas por um dano no desenvolvimento do circuito neural envolvido na modulação dos movimentos mastigatórios (Andrew, Parr, Sullivan, 2012).

Nos mamíferos, a maturação neuromuscular e funcional da mastigação ocorre durante o período crítico do desenvolvimento do sistema nervoso central, particularmente durante a gestação e lactação (Westneat, Hall, 1992). Durante esse período, ocorrem mudanças no padrão do consumo alimentar marcadas pela transição do comportamento de sucção para mastigação (Ferraz-Pereira et al., 2015). Em ratos, os primeiros movimentos mastigatórios foram observados no décimo segundo dia de vida pós-natal (Westneat, Hall, 1992). Contudo, o amadurecimento do padrão adulto da mastigação é finalizado no vigésimo primeiro dia de vida pós-natal (Bottinelli et al., 1991; Westneat, Hall, 1992). Nesse período, a escassez na oferta de alimento, pode interferir sobre o desenvolvimento de funções vitais para o organismo (Lucas, 1991). Entretanto, pouco se sabe sobre como fatores nutricionais, sobretudo a desnutrição proteica, pode exacerbar o impacto na mastigação observado na paralisia cerebral.

Nesse contexto, existem alguns modelos experimentais da paralisia cerebral, que tentam reproduzir os danos causados pela doença e isso permite, dentro dos devidos limites, a extrapolação para humanos (Johnston et al., 2005). Tais modelos vêm contribuindo na construção de potenciais terapias que visam minimizar a incapacidade crônica do distúrbio (Oliveira, 2009). Estudos mostram efeitos deletérios no músculo esquelético e na organização do córtex somatossensorial primário (S1), resultante da anóxia neonatal combinada à imobilização dos membros posteriores em ratos (Stigger et al., 2011). Portanto, a replicação desse modelo poderia esclarecer o impacto provocado sobre o comportamento alimentar, em particular a mastigação.

Dessa forma, observa-se que as alterações nutricionais e a paralisia cerebral acarretam severos comprometimentos estruturais e funcionais de diferentes órgãos e sistemas do organismo, em particular nas estruturas e funções do sistema estomatognático. A hipótese do nosso estudo é que a desnutrição perinatal agrava os danos mastigatórios em ratos submetidos ao modelo experimental de PC. Para elucidar tal hipótese, o objetivo do estudo foi investigar alguns mecanismos, sobretudo aqueles relacionados ao padrão sensório-motor da mastigação que

devem ser esclarecidos afim de minimizar os agravos relacionados ao quadro clínico e auxiliar na reabilitação dos indivíduos acometidos pela PC.

2. Materiais e Método

O projeto foi de caráter experimental com animais, realizado no laboratório de Fisiologia da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde UFPE – Recife e no laboratório do CAV (Centro Acadêmico de Vitória) UFPE – Vitória de Santo Antão. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE/CCB, processo nº 23076.025165/2014-10.

2.1 Animais

Foram utilizados 60 ratos machos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, provenientes de 10 ratas da colônia do Biotério de criação do Departamento de Nutrição. Os animais foram mantidos no Biotério de experimentação do Departamento de Nutrição da UFPE com temperatura de 22 + 2°C, ciclo claro-escuro de 12/12 horas, alojados em gaiolas, com livre acesso à água e alimentação. As fêmeas foram colocadas para acasalar com ratos machos da mesma espécie. Após a confirmação da gestação (G0), com auxílio da técnica de esfregaço vaginal (Marcondes, Bianchi et al., 2002), as fêmeas foram alojadas em gaiolas individuais e divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais, com base na manipulação dietética aplicada às ratas: Normonutrido (N, n=10) e Desnutrido (D, n=10). O grupo nutrido recebeu dieta normoprotéica com 17% de caseína enquanto que o grupo desnutrido recebeu dieta hipoprotéica com 8% de caseína (Reeves et al., 1993).

Logo após o nascimento, os filhotes foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, baseado na indução da paralisia cerebral experimental: grupo Normonutrido Controle (NC, n= 15), Normonutrido PC (NPC, n=15); Desnutrido Controle (DC, n=15) e Desnutrido PC (DPC, n=15). Os filhotes permaneceram com suas respectivas mães até o fim do período de lactação (P21). A partir do vigésimo segundo dia de vida pós-natal (P22), os animais foram separados de suas respectivas genitoras e mantidos em gaiolas com três a quatro animais advindos da mesma ninhada e do mesmo grupo experimental. A manipulação da dieta foi mantida até os 29 dias de vida pós-natal. Nesse último dia (P29), os animais foram

eutanasiados através da decapitação para retirada de tecidos para posterior análise histológica.

2.2 Modelo experimental de paralisia cerebral

O modelo experimental de paralisia cerebral baseou-se nos experimentos de Strata et al. (2004), Coq et al. (2008) e Marcuzzo et al. (2009). Este modelo associa a anóxia perinatal a um modelo de restrição sensório-motora dos membros posteriores semelhante à falta de movimento ocorrida na PC. Os animais selecionados aos grupos Normonutrido – PC e Desnutrido – PC foram submetidos a dois episódios de anóxia pós-natal, no dia do nascimento (P0) e no primeiro dia de vida pós-natal (P1). Após os dois episódios de anóxia, do segundo dia de vida (P2) ao vigésimo nono dia de vida pós natal (P28), os animais foram submetidos a restrição sensório motora das patas posteriores, a partir da utilização de uma ortese fixada na região do quadril. A colocação da órtese permitiu apenas movimentos limitados da articulação do quadril. Além disso, a manutenção da mesma não prejudicou a eliminação de urina e fezes, bem como os cuidados maternos.

2.3 Análise do peso corporal

O peso corporal dos filhotes foi verificado ao nascer, no 8º, 14º, 17º, 21º e 29º dia de vida pós-natal, para acompanhamento da taxa de crescimento desses animais. A pesagem dos animais foi feita a partir de uma balança eletrônica digital (Marte, modelo S-1000, capacidade de 1 Kg e sensibilidade de 0,1g).

2.4 Ingestão de leite

Os filhotes foram submetidos à avaliação da ingestão neonatal de leite durante as três semanas que compõem o período de lactação, a partir da adaptação do protocolo descrito por Perillan *et al.* (2007). Inicialmente os filhotes foram pesados com auxílio de uma balança de precisão (Marte, modelo AUW220). Em seguida, os neonatos foram separados de suas progenitoras durante duas horas e mantidos em uma caixa contendo maravalha aquecida. Após as duas horas de separação, os neonatos foram realocados junto as suas respectivas progenitoras durante uma hora e posteriormente repesados. A ingestão de leite foi calculada pelo resultado da subtração do peso corporal obtido depois da observação

comportamental pelo peso obtido anteriormente ao início desta. Para obtenção do peso corporal pré-observação, foi realizada estimulação genital para promover a excreção de urina e fezes (Hall et al., 1977). Esta consistiu de fricção de objeto macio sobre a região genital dos filhotes até o término da excreção. Esse procedimento garante maior confiabilidade à quantificação do consumo alimentar (Hall et al., 1977).

2.5 Análise dos parâmetros motores da função mastigatória

Os animais foram submetidos à análise dos parâmetros motores da função mastigatória aos 21 dias de vida pós-natal de acordo com o protocolo de Ferraz-Pereira et al (2015). O teste inicialmente consiste em submeter os animais a um período de três horas de privação alimentar. Após o período de privação alimentar, os animais foram alocados individualmente em uma gaiola de acrílico transparente e filmados durante 15 minutos para quantificação dos parâmetros motores da função mastigatória. No início da avaliação, foram colocados dentro da gaiola um grama de pequenos fragmentos de pellets de caseína para cada animal e posteriormente foi pesada a ração após o teste. A ingestão alimentar, referente ao consumo pós-desmame, foi obtido pela diferença do peso da ração antes e após a observação comportamental (Berridge, 2014). Por meio da análise dos vídeos, os seguintes parâmetros foram avaliados: duração do período de incisão e da mastigação rítmica, número de ciclos mastigatórios e frequência mastigatória. Para quantificação de tais parâmetros, os vídeos foram analisados por um avaliador cego para a identidade dos animais.

2.6 Análise da sensibilidade intra-oral

Aos 21 dias de vida pós-natal, os animais foram submetidos à análise da sensibilidade intra-oral a partir do protocolo de XX et al (2014). Inicialmente, os animais foram alocados individualmente em uma gaiola, e filmados durante dois minutos e meio por baixo de um piso transparente. O teste consistiu na administração de uma solução de sacarose (1%, 1ml), na boca do animal, por meio de uma seringa de 1ml acoplado a uma cânula de gavagem (Insight IC810). A Solução de sacarose (1%, 1ml) provoca as seguintes reações hedônicas positivas ou de "gosto": protrusões rítmicas da língua e lambe as patas. Os vídeos foram

analisados por um avaliador cego para a identidade dos animais para mensuração da duração e quantidade de reações de “gosto” realizadas por cada animal.

2.7 Coleta dos músculos e análise histoquímica

No vigésimo nono dia de vida pós-natal, os animais foram eutanasiados por decaptação, sendo o feixe superficial do músculo masseter e o ventre anterior do digástrico dissecados, imediatamente pesados e congelados. A massa de cada músculo (MM, em gramas) foi mensurada com auxílio de uma balança (Marte, modelo AUW220). Os músculos masseter e digástrico dos diferentes grupos experimentais foram fixados em N-Hexano, congelados, em seguida armazenados a -80 °C e usados para análise da distribuição dos tipos de fibras musculares.

Secções transversais (10µm) foram cortadas com um criostato mantido a -20°C. Os cortes foram fixados em lâminas e ao atingirem a temperatura ambiente foi iniciada a coloração. Para obtenção de coloração característica da atividade ATPase da miosina, foi utilizado o método proposto por Brooke e Kaiser (1970). Esta técnica permite a identificação das fibras musculares de acordo com a intensidade de reação à ATPase após a pré-incubação em meio ácido (pH 4,7), nos três tipos principais: I (fibras lentas oxidativas), IIa (fibras rápidas oxidativas-glicolítica) e IIb (fibras rápidas glicolíticas). (Cobos et al., 2001). Todas as fibras do feixe superficial do músculo masseter e do ventre anterior do músculo digástrico foram contadas em cada corte histológico e os valores referentes aos diferentes tipos de fibras foram expressos em percentual do número total. Os campos microscópicos foram obtidos através de microscópio óptico OLYMPUS modelo U-CMAD-2 (objetiva 40 X) acoplado a um programa para captação de imagens. Para contagem das células foi utilizado o software MENSURIN PRO versão 3.2 (Jean-François Madre-Amiens, França).

2.8 Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o software sigma (versão 6). Todas as variáveis passaram no teste de normalidade de Kolmogorov-smirnov. Para os dados de peso corporal e ingestão láctea foi feita uma análise de variância Two-Way com comparações múltiplas (Two-Way Repeated Measures). Para analisar os parâmetros motores da função mastigatória, consumo alimentar, a relação do consumo

alimentar pelo tempo, duração e quantidade das reações de gosto, peso e distribuição dos tipos de fibras dos músculos masseter e digástrico, foi realizado o teste ANOVA Two-Way. O teste Post Hoc utilizado em todas as análises foi o teste de Bonferroni. Os valores foram expressos em Média e Erro Padrão da Média (EPM). A significância estatística foi considerada com nível crítico de 5% em todos os casos.

3. Resultados

3.1 Peso corporal

Os animais do grupo NPC apresentaram redução do peso corporal a partir dos 14 dias de vida pós-natal comparado aos animais do grupo NC ($P < 0,05$). Além disso, foi observado redução mais acentuada do peso corporal dos animais do grupo DPC em todas as idades avaliadas quando comparado ao grupo NPC ($P < 0,05$) (Figura 1).

3.2 Ingestão Láctea

A ingestão de leite foi menor no grupo NPC durante a segunda ($0,030 \pm 0,001$) e terceira semana ($-0,096 \pm 0,005$) de vida pós-natal comparado ao grupo NC ($0,480 \pm 0,025$; $0,457 \pm 0,024$) ($P < 0,05$). Na terceira semana, os animais submetidos à paralisia cerebral experimental, NPC ($-0,096 \pm 0,090$) e DPC ($-0,101 \pm 0,004$), apresentaram valores negativos do consumo de leite, indicando que a ingestão foi compensada por um possível gasto energético para execução do comportamento alimentar (Figura 2).

3.3 Parâmetros motores da função mastigatória

O tempo gasto realizando sucessivas incisões para aquisição do alimento, isto é, a duração do período de incisão foi maior no grupo NPC ($2,76 \pm 0,359$) comparado ao grupo NC ($1,70 \pm 0,167$) ($P < 0,05$) (Figura 3A). Em relação à quantidade de ciclos mastigatórios realizados durante o período de mastigação rítmica, animais do grupo NPC apresentaram um declínio ($4,81 \pm 0,635$), comparado ao grupo NC ($7,332 \pm 0,669$) ($P < 0,05$) (Figura 3C). Quanto ao parâmetro frequência mastigatória que reflete a quantidade de ciclos mastigatórios executados por segundo, animais do grupo DPC, apresentaram uma redução ($2,71 \pm 0,123$)

comparado ao grupo NPC ($3,29 \pm 0,167$), indicando menor velocidade dos movimentos da mandíbula durante alimentação ($P < 0,05$) (Figura 3D).

3.4 Consumo alimentar pós-desmame e a relação do consumo alimentar pelo tempo

Animais do grupo DPC apresentaram menor consumo alimentar ($0,119 \pm 0,023$) pós-desmame comparado ao grupo NPC ($0,389 \pm 0,0483$) ($P < 0,05$) (Figura 4A). Quando o consumo alimentar foi relacionado com o tempo gasto durante a alimentação, os mais prejudicados foram os animais do grupo DPC ($0,00016 \pm 0,0001$) comparado ao grupo NPC ($0,00091 \pm 0,0001$) ($P < 0,05$) (Figura 4B).

3.5 Reatividade ao sabor

Ao receber a solução contendo sacarose, os animais do grupo DPC ($10,2 \pm 4,56$) gastaram menos tempo realizando as reações de “gosto”, comparado ao grupo NPC ($29,8 \pm 13,32$) ($P < 0,05$) (Tabela1).

3.6 Propriedades musculares

3.6.1 Peso dos músculos e peso relativo

O peso do feixe superficial do músculo masseter e do ventre anterior do músculo digástrico foi menor no grupo DPC (Mas: $0,063 \pm 0,004$; Dig: $0,036 \pm 0,001$), comparado aos animais do grupo NPC (Mas: $0,106 \pm 0,006$; Dig: $0,061 \pm 0,003$) ($P < 0,05$) (Figura 5A e 5B). Quanto ao peso relativo, os animais do grupo NPC ($0,0015 \pm 0,002$), apresentaram uma redução comparado ao grupo NC ($0,0017 \pm 0,003$) ($P < 0,05$) (Figura 5C e 5D).

3.6.2 Distribuição dos tipos de fibras musculares

No feixe superficial do músculo masseter, os animais do grupo NPC, apresentaram aumento na proporção das fibras tipo IIA (NPC: $66,59 \pm 0,297$) associado à redução na proporção das fibras do tipo IIB (NPC: $32,30 \pm 0,145$) comparado ao grupo NC (fibra IIA: $57,19 \pm 0,255$; fibra IIB: $42,02 \pm 0,187$) ($P < 0,05$). Esse efeito também foi observado, de forma mais acentuada no grupo DPC (fibra IIA: $70,66 \pm 0,316$; fibra IIB: $28,73 \pm 0,128$) comparado ao grupo NPC ($P < 0,05$) (Figura 6A).

Em relação ao ventre anterior do músculo digástrico, houve aumento na proporção das fibras IIA, associado à redução nas fibras tipo I nos animais do grupo NPC (fibra I: $11,66 \pm 0,052$; fibra IIA: $56,66 \pm 0,253$) ($P < 0,05$). Quanto aos animais do grupo DPC (fibra I: $8,49 \pm 0,037$; fibra IIA: $59,29 \pm 0,265$), foi observado redução na proporção das fibras tipo I, comparado ao grupo NPC ($P < 0,05$) (Figura 6B).

4. Discussão

No presente estudo, animais submetidos ao modelo experimental de paralisia cerebral desenvolveram redução do peso corporal, no consumo alimentar (ingestão láctea e alimentação pós-desmame), bem como apresentaram prejuízos sobre aspectos funcionais e morfológicos da mastigação. Associado a isso, a desnutrição proteica perinatal acentuou a intensidade na maior parte desses déficits em animais paralíticos.

A indução da paralisia cerebral experimental (anóxia perinatal combinado à restrição sensório-motora das patas posteriores), provocou redução do peso corporal em ratos aos 14, 17, 21 e 29 dias de vida pós-natal. Esses dados corroboram com os estudos que utilizaram o mesmo modelo experimental de PC, onde foi observado semelhante redução do peso corporal em animais submetidos à PC experimental (Marcuzzo et al., 2008; Strata et al., 2004). Outro achado do presente estudo foi que a desnutrição proteica quando combinada à PC experimental, potencializou o declínio no peso corporal dos filhotes observado em todas as idades avaliadas. Esses dados corroboram com o estudo de Sanches e colaboradores, onde foi observado em animais submetidos à hipóxia-isquemia associado a desnutrição proteica, uma redução do peso corporal mais expressiva comparado aqueles animais expostos apenas a hipóxia-isquemia (Sanches et al., 2013).

Os animais que sofreram paralisia cerebral experimental apresentaram redução mais pronunciada do consumo do leite materno, chegando a valores negativos aos 19 e 20 dias de vida pós-natal. Os valores negativos foram obtidos em virtude do peso do animal após uma hora de amamentação ter sido inferior ao peso observado antes do teste. Isso sugere que a ingestão de leite desses animais tenha sido limitada pelo desenvolvimento de possíveis disfunções orofaciais. Estudos experimentais onde a paralisia cerebral foi induzida pela hipóxia-isquemia ou inflamação materna, foram observados prejuízos na coordenação da sucção e

deglutição (Derrick et al., 2007). Tal impacto foi evidenciado pela regurgitação nasal do leite até a perda do leite por gotejamento em virtude da incapacidade de reter o mesmo dentro da cavidade oral (Sadanni et al, 2011). Associado a isso, a redução da ingestão de leite materno verificada no presente estudo pode ter contribuído para o declínio no peso corporal observado durante o período de lactação.

No presente estudo, a indução da paralisia cerebral comprometeu a eficiência mastigatória, demonstrado a partir da modificação de parâmetros motores da função mastigatória. Foi verificado um aumento do tempo do período de incisão associado a um declínio no número de ciclos mastigatórios e da frequência mastigatória em animais submetidos a PC experimental. Outro achado do presente estudo foi que a desnutrição quando associada a PC experimental, promoveu uma redução mais acentuada da frequência mastigatória. Em ratos submetidos à hipóxia-isquemia, foi observado desenvolvimento de prejuízos motores, incluindo déficits de coordenação e na atividade locomotora (Stigger et al, 2012). Dessa forma, sugere-se que essas alterações motoras corporais possam ter limitado o desempenho da função mastigatória observada no presente estudo. Ademais os danos motores podem estar associados a alterações neurológicas observadas em modelos experimentais de PC. Estudos revelam que animais submetidos a PC experimental desenvolvem ativação das micróglia em diversos segmentos do encéfalo, sobretudo a substância branca (Kannan et al., 2011). Uma vez ativadas, as micróglia promovem injúria neuronal e de oligodendrócitos, ocorrendo uma perda neuronal associado a hipomielinização de áreas nobres do sistema nervoso central (Saadani et al., 2008). Também é observado aumento no número e hipertrofia dos astrócitos em múltiplas áreas da substância branca, sobretudo na zona periventricular (Chua et al., 2009). Esses danos prejudicam a irrigação sanguínea e a disponibilidade de oxigênio e glicose no tecido nervoso (Balasubramaniam et al., 2006). Portanto, é provável que a injúria em estruturas nobres do encéfalo seja um possível mecanismo responsável por modificar funções motoras vitais para o organismo, como a função mastigatória.

Quanto ao consumo alimentar pós-desmame, houve um declínio de quase 70% em animais submetidos à desnutrição associado a PC experimental, comparado aos valores obtidos pelos animais submetidos apenas a PC experimental. Além disso, avaliamos a relação da quantidade de ração ingerida pelo tempo gasto pelo animal para poder se alimentar. Os mais prejudicados foram

novamente aqueles submetidos a PC experimental associado à desnutrição perinatal, isto é, consumiram uma menor quantidade de ração, gastando mais tempo para poder se alimentar. Esses dados sugerem que o aumento no tempo da alimentação tenha sido uma possível estratégia para compensar a grave redução na frequência mastigatória. Entretanto, tal compensação não foi suficiente em reverter o declínio do consumo alimentar. Associado a isso, a redução no consumo alimentar pós-desmame também pode ter contribuído para a diminuição do peso corporal observado nos filhotes após o desmame.

Nosso estudo também verificou que a indução da PC experimental associado a desnutrição perinatal, promoveu uma queda de 70% na duração de reações de gosto, comparado aos animais submetidos apenas à indução da paralisia cerebral. Esses animais se mostravam menos responsivos ao receber o estímulo hedônico oferecido pela administração de uma solução contendo sacarose. É importante ressaltar que o papel da reatividade ao sabor não se restringe apenas em influenciar as preferências alimentares, seleção da dieta e iniciação da alimentação, como também desempenha papel importante sobre a integridade das funções do sistema digestório (Ohara, 1985). Diante disso, é provável que o declínio na percepção do sabor doce tenha repercutido sobre a eficiência mastigatória, observada a partir da redução dos parâmetros motores da função mastigatória.

Propriedades musculares também foram modificadas nos animais submetidos a PC experimental. No presente estudo, o peso do feixe superficial do músculo masseter bem como do ventre anterior do músculo digástrico foi reduzido nos animais paráliticos. Também foi verificada redução do peso relativo do músculo masseter nesses animais. Em animais do grupo DPC, a queda do peso em ambos os músculos foi mais expressiva, demonstrando que a desnutrição proteica foi capaz de acentuar os danos nos músculos mastigatórios. Em estudos prévios foi observado redução do peso dos músculos Sóleo e no Tibial Anterior em animais submetidos ao mesmo modelo experimental de PC (Marcuzzo et al., 2008; Stigger et al., 2011). Além disso, a redução no peso dos músculos masseter e digástrico pode estar relacionado com o desenvolvimento de espasticidade muscular. Foi demonstrado em estudos experimentais que animais com paralisia cerebral desenvolvem aumento do tônus (espasticidade) dos músculos das patas anteriores e posteriores (Saadani et al., 2008; Derrick et al., 2004). Nesse sentido, é provável que os modelos de paralisia também promovam hipertonia dos músculos

mastigatórios, sendo um possível mecanismo que justifique as alterações nos parâmetros motores da mastigação observado no presente estudo.

A distribuição dos tipos de fibras musculares foi a outra propriedade avaliada. No digástrico, houve uma redução na proporção das fibras tipo I, associado a um aumento na proporção de fibras tipo IIA nos animais paralíticos e desnutridos. Esse achado corrobora com o estudo de Stigger e colaboradores, onde foi demonstrado em ratos submetidos à restrição sensório-motora associado a anóxia perinatal, um aumento na proporção de fibras tipo II e uma redução nas fibras tipo I nos músculos Tibial Anterior e Sóleo (Stigger et al., 2011). Quanto ao feixe superficial do músculo masseter, nosso estudo verificou um aumento na proporção das fibras IIA combinado a uma redução nas fibras IIB nos animais expostos a desnutrição e PC experimental. A menor proporção de fibras IIB, observado no presente estudo, pode refletir um atraso na maturação do músculo masseter. Evidências experimentais demonstraram que nas primeiras duas semanas de vida, o músculo masseter é formado predominantemente por fibras tipo IIA (Langenbach et al., 2008). No entanto, a medida que ocorre a transição do comportamento de sucção para mastigação, ocorre um aumento na proporção das fibras IIB (Langenbach et al., 2008). Em virtude da fibra tipo IIB apresentar maior força e velocidade de contração muscular (Kawai et al., 2009), sugere-se que a redução na sua proporção pode resultar em movimentos mastigatórios menos eficazes em triturar o alimento no interior da cavidade oral.

As modificações nas proporções das fibras do ventre anterior do músculo digástrico e feixe superficial do músculo masseter, foram mais evidentes nos animais submetidos a paralisia cerebral experimental associado à desnutrição perinatal. No entanto, a ausência de estudos na literatura que investiguem como a desnutrição pode potencializar os danos orais da paralisia cerebral, limita a compreensão dos mecanismos envolvidos em tal impacto. O nosso estudo sugere que as alterações nas propriedades musculares, podem justificar a intensificação dos danos nas funções sensório-motoras da mastigação, bem como a redução do consumo alimentar pela sucção e mastigação. Isto é, o comprometimento na estrutura muscular parece explicar os efeitos deletérios nas funções orofaciais relacionadas à alimentação, podendo repercutir de forma adversa sobre a digestão e absorção dos nutrientes pelo sistema digestivo.

5. Conclusão

A indução da paralisia cerebral experimental provocou déficits na estrutura dos músculos mastigatórios, bem como em parâmetros sensório-motores da mastigação. O prejuízo em aspectos morfológicos dos músculos masseter e digástrico, repercutiu sobre a integridade das funções sensoriais e motoras da mastigação. Ademais tal agravo limitou a capacidade do animal em se alimentar, a partir da redução da ingestão de leite materno e consumo de alimentos sólidos. Os danos na capacidade da alimentação também promoveram redução do peso corporal dos filhotes.

Além disso, nosso estudo constatou que os déficits mastigatórios foram agravados quando a indução da paralisia cerebral experimental foi associada a desnutrição perinatal. Dessa forma, a privação de nutrientes, particularmente a desnutrição proteica perinatal, pode acentuar os efeitos deletérios da mastigação observados em modelo experimental de paralisia cerebral.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio prestado através de bolsas e auxílios, aos integrantes do Laboratório de Fisiologia da Nutrição da UFPE de Recife pelo apoio prestado durante o período da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ANDREW, M. J.; PARR, J. R.; SULLIVAN, P. B. Feeding difficulties in children with cerebral palsy. **Arch Dis Child Educ Pract Ed**, 97, 6, 222-229, Dec, 2012.

BALASUBRAMANIAM J, XUE M, BUIST RJ, TAMMY L. IVANCO, SHANNON NATUIK , MARC R. DEL BIGIO. Persistent motor deficit following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. **Experimental Neurology** 197 (2006) 122 – 132.

BENFER, K. A.; WEIR, K. A.; BELL, K. L.; WARE, R. S.; DAVIES, P. S.; BOYD, R. N. Longitudinal cohort protocol study of oropharyngeal dysphagia: relationships to gross motor attainment, growth and nutritional status in preschool children with cerebral palsy. **BMJ Open**, 2, 4, 2012.

BENFER, K. A.; WEIR, K. A.; BELL, K. L.; WARE, R. S.; DAVIES, P. S.; BOYD, R. N. Oropharyngeal dysphagia in preschool children with cerebral palsy: oral phase impairments. **Res Dev Disabil**, 35, 12, 3469-3481, Dec, 2014.

BOTTINELLI, R.; SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. **J Physiol**, 437, 655-672, Jun, 1991.

BROOKE, M. H.; KAISER, K. K. Muscle fiber types: how many and what kind? **Arch Neurol**, 23, 4, 369-379, Oct, 1970.

CHUA C.O, MD; CHAHBOUNE H; BRAUN, MD; DUMMULA, MD; CHUA CE; JEN YU, MA; ZOLTAN UNGVARI, MD; SHERBANY, MD; FAHMEED HYDER; BALLABH, MD. Consequences of Intraventricular Hemorrhage in a Rabbit Pup Model. **Stroke**. 2009;40:3369-3377.

COQ, J. O.; STRATA, F.; RUSSIER, M.; SAFADI, F. F.; MERZENICH, M. M.; BYL, N. N.; BARBE, M. F. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. **Exp Neurol**, 210, 1, 95-108, Mar, 2008.

DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; PASSOS, M. C. Neonatal programming of neuroimmunomodulation--role of adipocytokines and neuropeptides. **Neuroimmunomodulation**, 15, 3, 176-188, 2008.

DERRICK, M.; DROBYSHEVSKY, A.; JI, X.; TAN, S. A model of cerebral palsy from fetal hypoxia-ischemia. **Stroke**, 38, 2 Suppl, 731-735, Feb, 2007.

DERRICK, M, NING LING LUO, JOANNE C. BREGMAN, TAMAS JILLING, XINHAI JI, KARA FISHER, CANDECE L. GLADSON, DOUGLAS J. Beardsley, Geoffrey Murdoch, Stephen A. Back, Sidhartha Tan. **The Journal of Neuroscience**, January 7, 2004 • 24(1):24 –34

FERRAZ-PEREIRA, K. N.; DA SILVA ARAGAO, R.; VERDIER, D.; TOSCANO, A. E.; LACERDA, D. C.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; KOLTA, A. Neonatal low-protein diet reduces the masticatory efficiency in rats. **Br J Nutr**, 114, 9, 1515-1530, Nov 14, 2015.

FORBES, W. B.; TRACY, C.; RESNICK, O.; MORGANE, P. J. Effects of maternal dietary protein restriction on growth of the brain and body in the rat. **Brain Res Bull**, 2, 2, 131-135, Mar-Apr, 1977.

GALLER, J. R.; RAMSEY, F.; SOLIMANO, G. A follow-up study of the effects of early malnutrition on subsequent development. I. Physical growth and sexual maturation during adolescence. **Pediatr Res**, 19, 6, 518-523, Jun, 1985.

HIMMELMANN, K.; BECKUNG, E.; HAGBERG, G.; UVEBRANT, P. Gross and fine motor function and accompanying impairments in cerebral palsy. **Dev Med Child Neurol**, 48, 6, 417-423, Jun, 2006.

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

JOHNSTON, M. V.; FERRIERO, D. M.; VANNUCCI, S. J.; HAGBERG, H. Models of cerebral palsy: which ones are best? **J Child Neurol**, 20, 12, 984-987, Dec, 2005.

KANNAN S, SAADANI-MAKKI F, BALAKRISHNAN B, CHAKRABORTY P, JANISSE J, LU X, MUZIK O, ROMERO R, CHUGANI DC. Magnitude of [11 C]PK11195 Binding Is Related to Severity of Motor Deficits in a Rabbit Model of Cerebral Palsy Induced by Intrauterine Endotoxin Exposure. **Dev Neurosci** 2011;33:231–240.

KAWAI, N.; SANO, R.; KORFAGE, J. A.; NAKAMURA, S.; TANAKA, E.; VAN WESSEL, T.; LANGENBACH, G. E.; TANNE, K. Functional characteristics of the rat jaw muscles: daily muscle activity and fiber type composition. **J Anat**, 215, 6, 656-662, Dec, 2009.

KRIGGER, K. W. Cerebral palsy: an overview. **Am Fam Physician**, 73, 1, 91-100, Jan 1, 2006.

LANGENBACH, G. E.; VAN WESSEL, T.; BRUGMAN, P.; KORFAGE, J. A.; VAN EIJDEN, T. M. Is fiber-type composition related to daily jaw muscle activity during postnatal development? **Cells Tissues Organs**, 187, 4, 307-315, 2008.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, 156, 38-50; discussion 50-35, 1991.

MANCINI, M. C.; FIUZA, P. M.; REBELO, J. M.; MAGALHAES, L. C.; COELHO, Z. A.; PAIXAO, M. L.; GONTIJO, A. P.; FONSECA, S. T. [Comparison of functional activity performance in normally developing children and children with cerebral palsy]. **Arq Neuropsiquiatr**, 60, 2-B, 446-452, Jun, 2002.

MARCUZZO, S.; DUTRA, M. F.; STIGGER, F.; DO NASCIMENTO, P. S.; ILHA, J.; KALIL-GASPAR, P. I.; ACHAVAL, M. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. **Brain Dev**, 32, 4, 323-331, Apr, 2010.

NAKAJIMA, I.; OHNISHI, T.; NAGASAWA, A.; SEKI, M.; TAKANASHI, N.; TAKEI, K.; MAEDA, T.; OGURA, T.; AKASAKA, M. Relationship between the values of masticatory efficiency and biting pressure in children with cerebral palsy--inter-relationship between the maximum biting pressure, chewing cycle and the value of masticatory efficiency. **J Nihon Univ Sch Dent**, 30, 3, 244-260, Sep, 1988.

OLIVEIRA L.V.F. Da bancada ao leito: a partir de um diagnóstico preciso para o tratamento adequado. O uso crescente da pesquisa translacional. **ConScientiae Saúde** 2009;8:545-547

OHARA, I.; TABUCHI, R.; KIMURA, M.; ITOKAWA, Y. Decline of taste sensitivity in protein deficient adult rats. **Physiol Behav**, 57, 5, 921-926, May, 1995.

ORTEGA, A. O.; GUIMARAES, A. S.; CIAMPONI, A. L.; MARIE, S. K. Frequency of temporomandibular disorder signs in individuals with cerebral palsy. **J Oral Rehabil**, 35, 3, 191-195, Mar, 2008.

PERILLAN, C.; COSTALES, M.; VIJANDE, M.; ARGUELLES, J. Maternal RAS Influence on the Ontogeny of Thirst. **Physiol Behav**, 92, 554-559, April, 2007.

SAADANI-MAKKI F, KANNAN S, LU X, ET AL. Intrauterine administration of endotoxin leads to motor deficits in a rabbit model: a link between prenatal infection and cerebral palsy. **Am J Obstet Gynecol** 2008;199-651

SANCHES, E. F.; ARTENI, N. S.; NICOLA, F.; BOISSERAND, L.; WILLBORN, S.; NETTO, C. A. Early hypoxia-ischemia causes hemisphere and sex-dependent cognitive impairment and histological damage. **Neuroscience**, 237, 208-215, May 1, 2013.

SERDAROGLU, A.; CANSU, A.; OZKAN, S.; TEZCAN, S. Prevalence of cerebral palsy in Turkish children between the ages of 2 and 16 years. **Dev Med Child Neurol**, 48, 6, 413-416, Jun, 2006.

STIGGER, F.; FELIZZOLA, A. L.; KRONBAUER, G. A.; COUTO, G. K.; ACHAVAL, M.; MARCUZZO, S. 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. **Exp Neurol**, 228, 2, 183-191, Apr, 2011.

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

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review). **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83, 5, 1388-1392, Mar, 1986.

WESTNEAT, M. W.; HALL, W. G. Ontogeny of feeding motor patterns in infant rats: an electromyographic analysis of suckling and chewing. **Behav Neurosci**, 106, 3, 539-554, Jun, 1992.

YEARGIN-ALLSOPP, M.; VAN NAARDEN BRAUN, K.; DOERNBERG, N. S.; BENEDICT, R. E.; KIRBY, R. S.; DURKIN, M. S. Prevalence of cerebral palsy in 8-year-old children in three areas of the United States in 2002: a multisite collaboration. **Pediatrics**, 121, 3, 547-554, Mar, 2008.

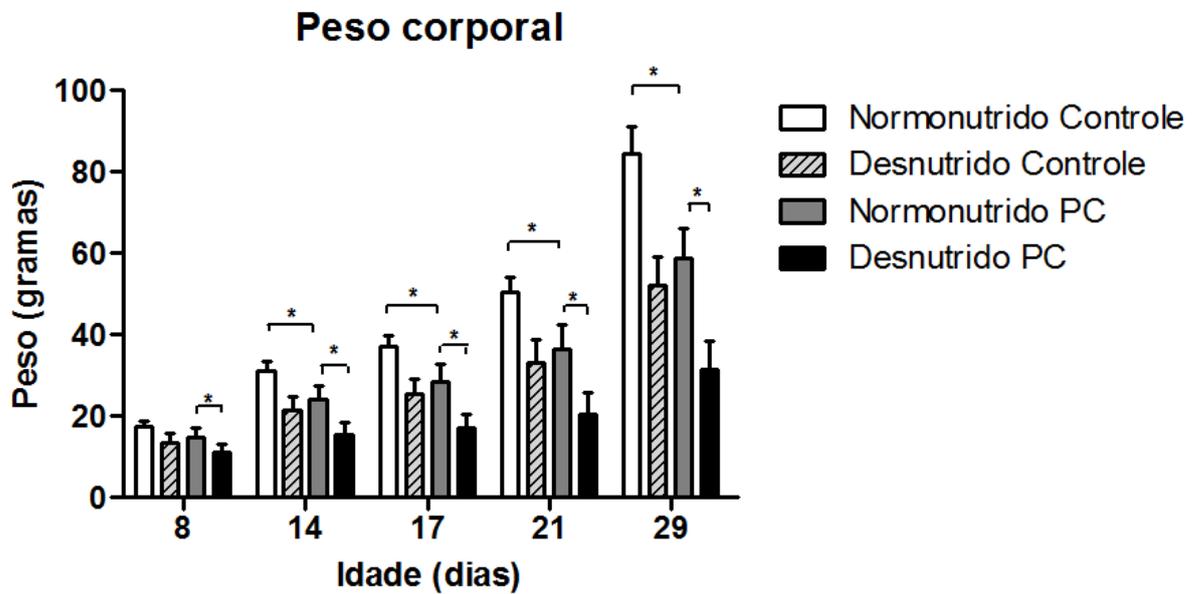


Figura 1: Evolução do peso corporal de ratos normonutrido controle (n = 15), desnutrido controle (n = 15), normonutrido PC (n = 15) e desnutrido PC (n = 15) aos 8, 14, 17, 21 e 28 dias de vida. Os dados foram expressos em Média \pm EPM.* Diferença estatística significativa entre os grupos. (P<0,05).

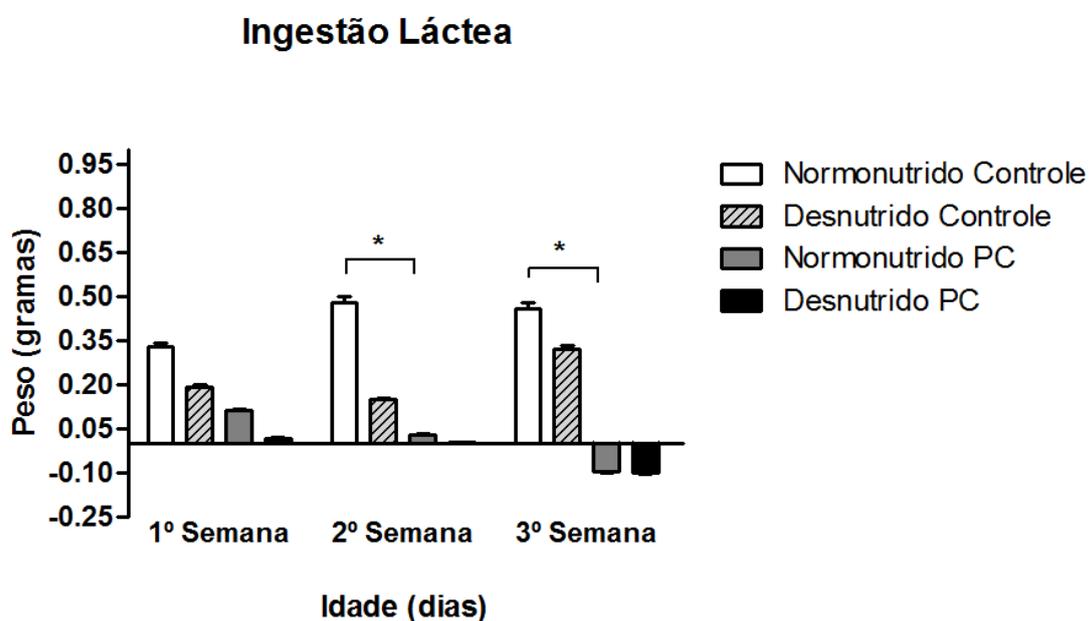


Figura 2: Evolução da ingestão láctea ratos normonutrido controle (n = 15), desnutrido controle (n = 15), normonutrido PC (n = 15) e desnutrido PC (n = 15) aos 7, 8, 14, 15, 19 e 20 dias de vida. Os dados foram expressos em Média \pm EPM. Os dados foram expressos em Média \pm EPM. * Diferença estatística significativa entre os grupos. (P<0,05).

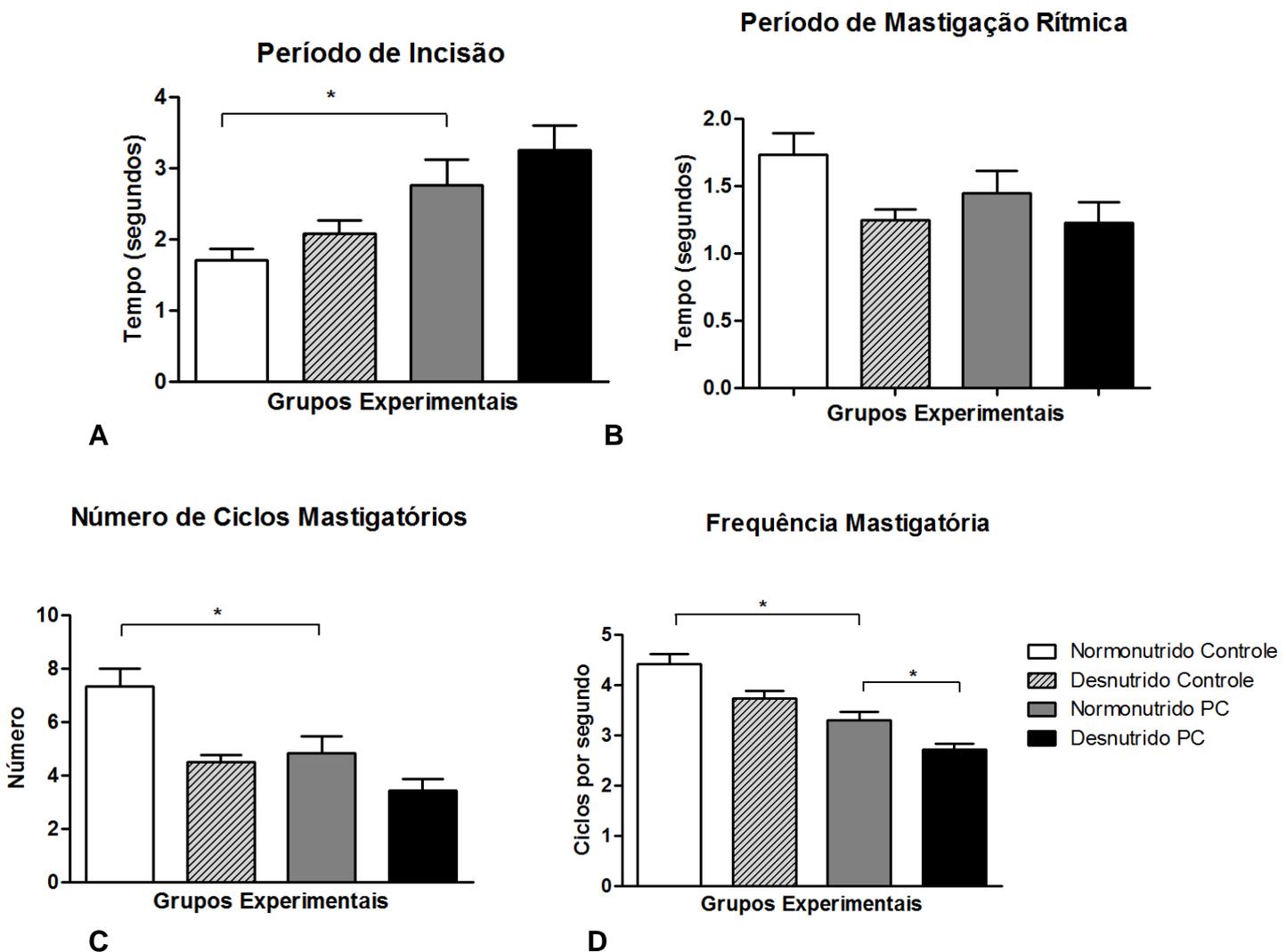


Figura 3: Duração em segundos do período de incisão (figura 3A), período de mastigação rítmica (figura 3B), número de ciclos mastigatórios (figura 3C) e frequência mastigatória (figura 3D) dos ratos normonutrido controle (n = 10),

desnutrido controle (n = 10), normonutrido PC (n = 10) e desnutrido PC (n = 10) aos 21 dias de vida. Os dados foram expressos em Média \pm EPM. * Diferença estatística significativa entre os grupos. (P<0,05).

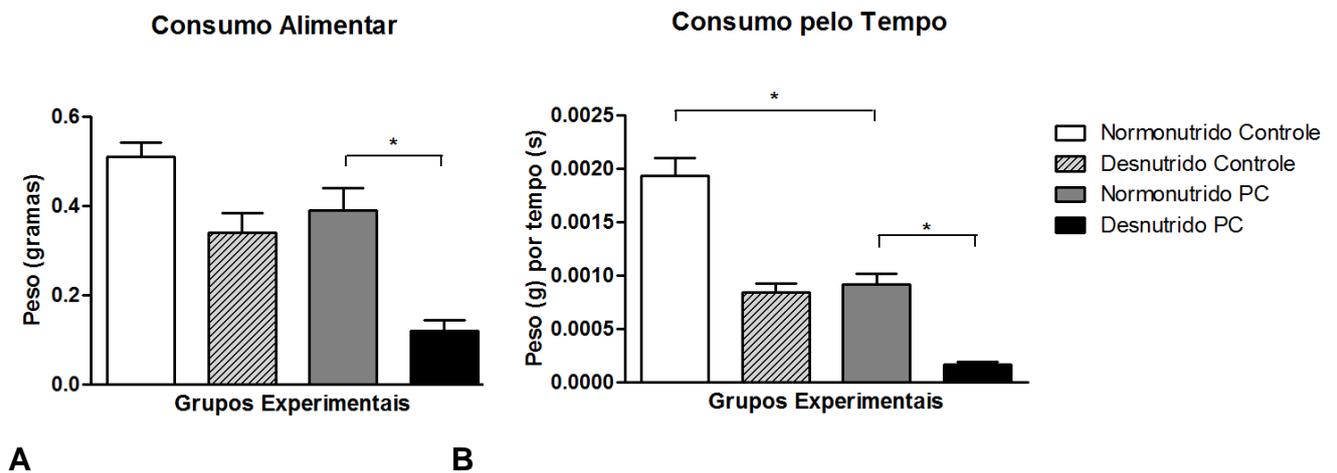


Figura 4: Consumo alimentar (figura 4A) e relação do consumo pelo tempo de alimentação (figura 4B) dos ratos normonutrido controle (n = 10), desnutrido controle (n = 10), normonutrido PC (n = 10) e desnutrido PC (n = 10) aos 21 dias de vida. Os dados foram expressos em Média \pm EPM. * Diferença estatística significativa entre os grupos. (P<0,05).

Grupos	NC	DC	DC	DPC	P
Duração	38,6 \pm 17,26	28,6 \pm 12,79	29,8 \pm 13,32	10,2 \pm 4,56	<0,05
Quantidade	10,6 \pm 4,74	5,4 \pm 2,41	6,6 \pm 2,95	2,4 \pm 1,07	<0,05*

Tabela 1: Duração e quantidade das reações de gosto induzidas pelo sabor doce dos ratos normonutrido controle (n = 5), desnutrido controle (n = 5), normonutrido PC (n = 5) e desnutrido PC (n = 5) aos 21 dias de vida. Os dados foram expressos

em Média \pm EPM. * Diferença estatística significativa entre os grupos DPC e NPC ($P < 0,05$).

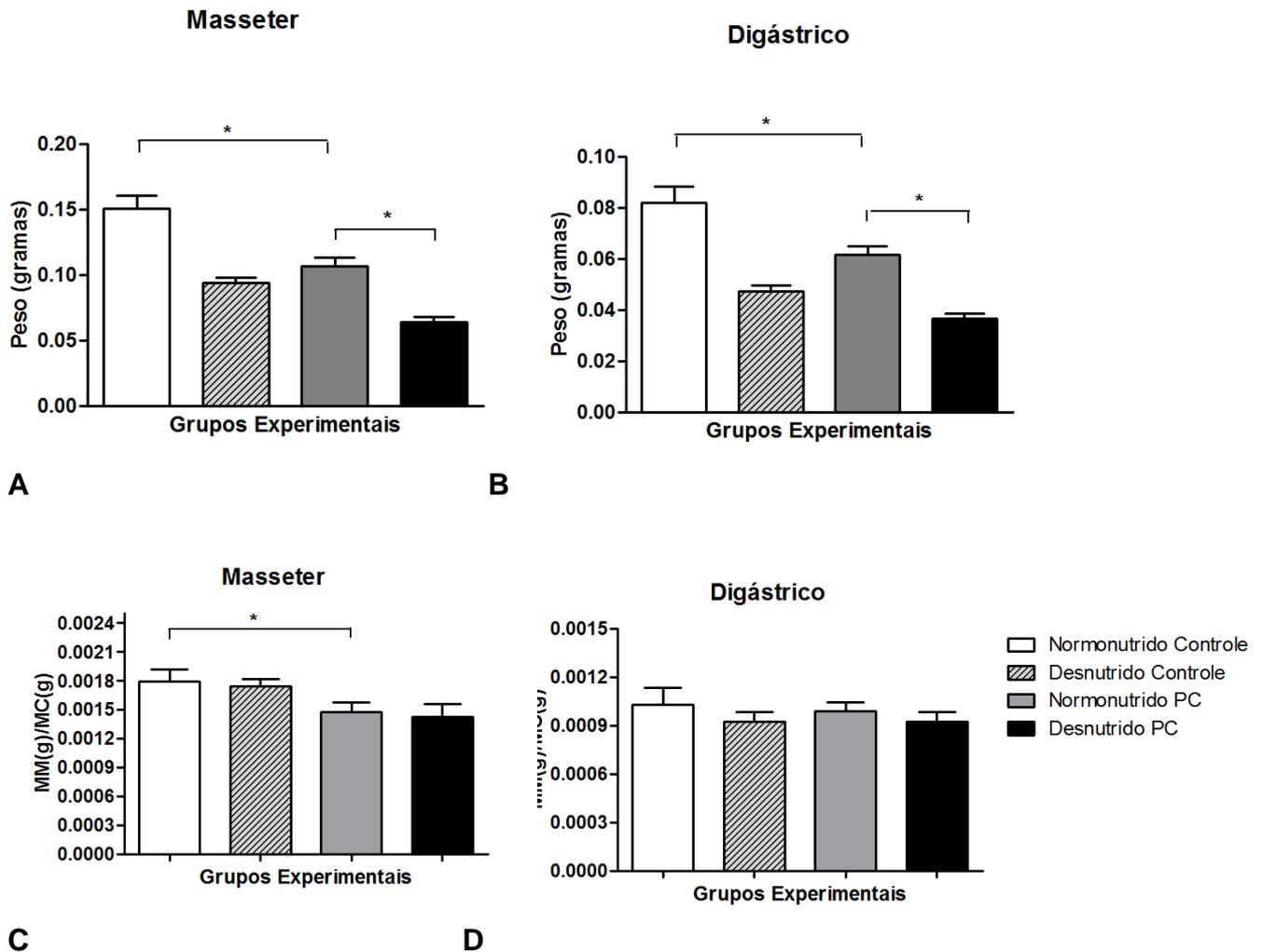
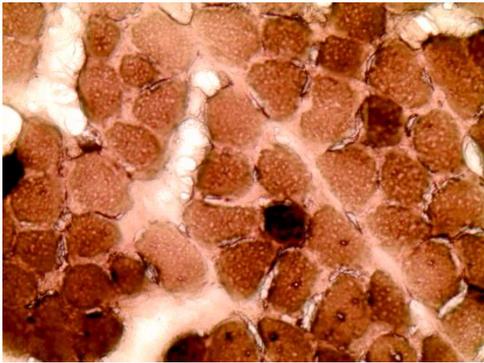
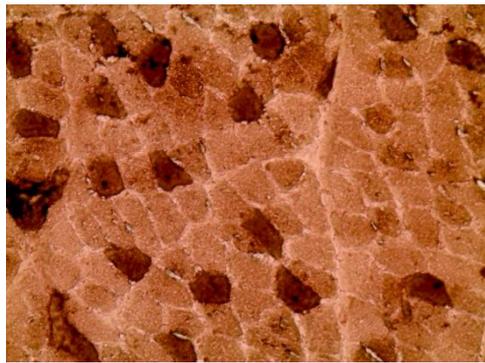


Figura 5: Peso em gramas e peso relativo dos músculos Masseter (figura 5A e 5C) e do Digástrico (figura 5B e 5D) dos ratos normonutrido controle ($n = 15$), desnutrido controle ($n = 15$), normonutrido PC ($n = 15$) e desnutrido PC ($n = 15$) aos 29 dias de vida. Os dados foram expressos em Média \pm EPM. * Diferença estatística significativa entre os grupos DPC e NPC. ($P < 0,05$).

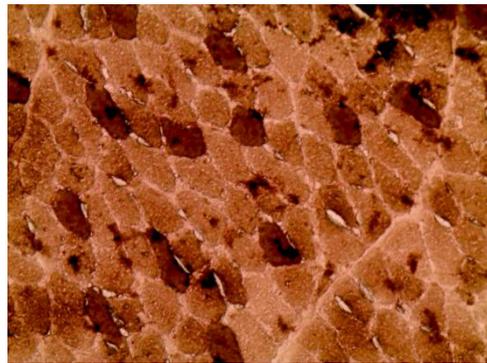
(A) NC Masseter



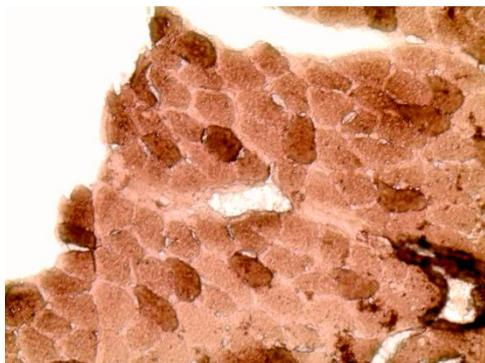
(B) DC Masseter



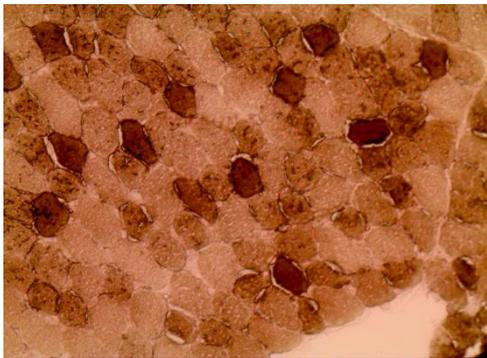
(C) NPC Masseter



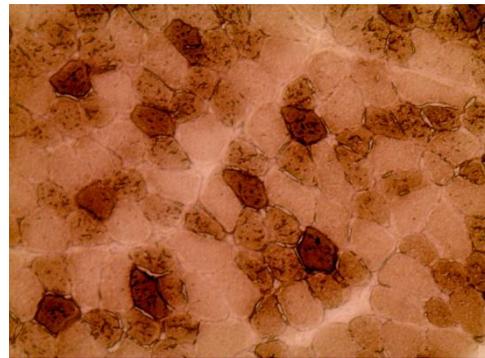
(D) DPC Masseter



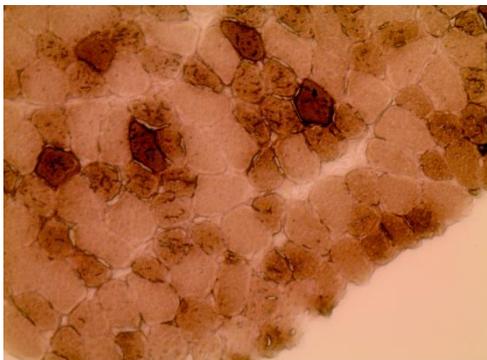
(E) NC Digástrico



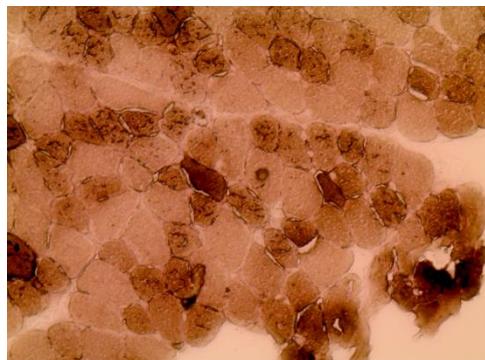
(F) DC Digástrico



(G) NPC Digástrico



(H) DPC Digástrico



(6)

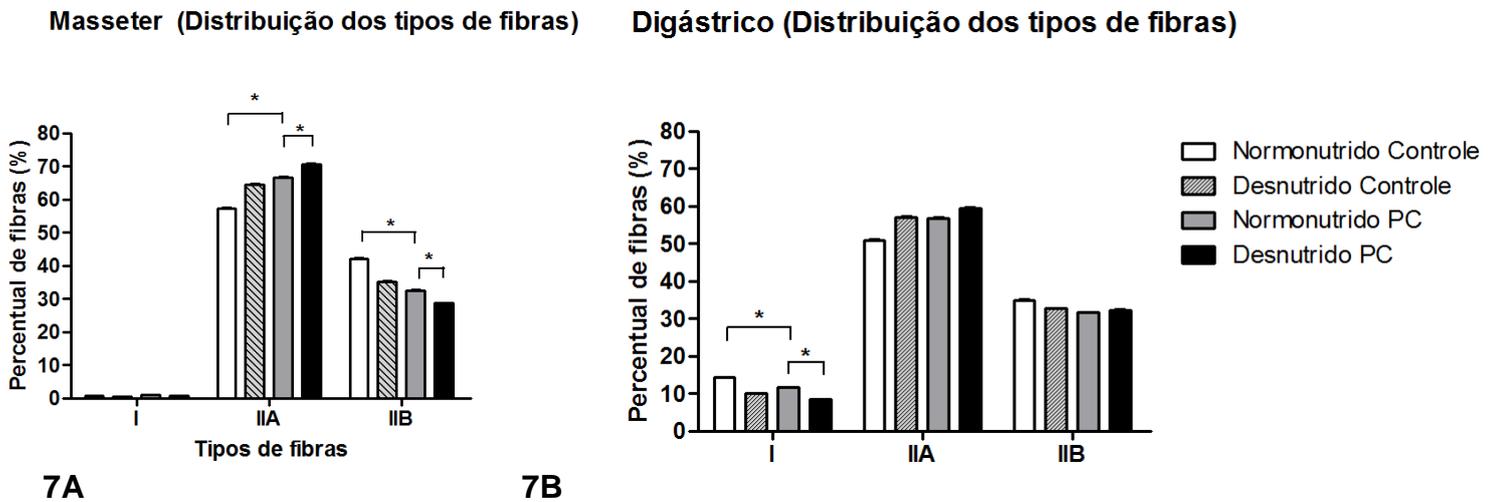
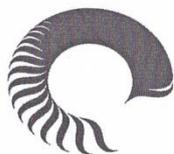


Figura 6 e 7: Imagens obtidas a partir de cortes transversais dos músculos corados em ATPase miofibrilar cálcio-ativada (mATPase), após pré-incubação pH4,7. As fibras musculares foram classificadas de acordo com a intensidade de reação à ATPase após a pré-incubação nos três tipos principais: I (escura), IIA (clara) e IIB (acinzentada). Distribuição dos tipos de fibras musculares do músculo masseter (figura 7A) e digástrico (figura 7B) dos ratos normonutrido controle (n = 5), desnutrido controle (n = 5) normonutrido PC (n = 5) e desnutrido PC (n = 5) aos 29 dias de vida. * Diferença estatística significativa entre os grupos DPC e NPC. (P<0,05).

ANEXO



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 9 de outubro de 2014.

Ofício nº 57/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro**
Centro Acadêmico de Vitória - CAV
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.025165/2014-10

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Estudo do padrão sensório-motor da mastigação: Implicações da desnutrição perinatal sobre a paralisia cerebral experimental**".

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

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

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

Origem dos animais: Biotério de criação do Departamento de Nutrição da UFPE; Animal: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: 90-120 dias; Peso: Após 220-250g; Sexo: machos e fêmeas; Número total de animais previsto no protocolo: 62.

Atenciosamente,

Marcia Vasconcelos
Prof.ª Marcia Vasconcelos
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2199635

CCB: Integrar para desenvolver