



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NEUROPSIQUIATRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

BÁRBARA JUACY RODRIGUES COSTA DE SANTANA

**MICROCEFALIA EXPERIMENTAL: estudo do desenvolvimento somático,
sensório-motor, coordenação motora e do fenótipo muscular esquelético em
ratos jovens**

Recife

2019

BÁRBARA JUACY RODRIGUES COSTA DE SANTANA

MICROCEFALIA EXPERIMENTAL: estudo do desenvolvimento somático, sensório-motor, coordenação motora e do fenótipo muscular esquelético em ratos jovens

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Neurociências.

Área de concentração: Neurociências.

Orientadora: Prof^{fa}. Dr^a. Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro.

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

Recife

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S232m Santana, Bárbara Juacy Rodrigues Costa de.

Microcefalia experimental: estudo do desenvolvimento somático, sensório-motor, coordenação motora e do fenótipo muscular esquelético em ratos jovens / Bárbara Juacy Rodrigues Costa de Santana. – 2019.

129 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Microcefalia. 2. Treinamento de resistência. 3. Deficiências do desenvolvimento. 4. Atividade locomotora. 5. Desempenho sensório-motor 5. I. Castro, Ana Elisa Toscano Meneses da Silva (Orientadora). II. Título.

616.858884 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2019-124)

BÁRBARA JUACY RODRIGUES COSTA DE SANTANA

**MICROCEFALIA EXPERIMENTAL: estudo do desenvolvimento somático,
sensório-motor, coordenação motora e do fenótipo muscular esquelético em
ratos jovens**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria
e Ciências do Comportamento da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do
Título de Mestre em Neurociências.

Aprovada em 25/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sandra Lopes de Souza

Universidade Federal de Pernambuco (Examinador Interno)

Dr^a. Tássia Karin Ferreira Borba

Universidade Federal de Pernambuco (Examinador Externo)

Prof^a. Dr^a. Elizabeth do Nascimento

Universidade Federal de Pernambuco (Examinador Externo)

Aos meus pais Marcelon e Ediganeide, que com tanto amor e carinho sempre me incentivaram a buscar o melhor, animaram o meu ânimo em momentos turbulentos e me fizeram acreditar que sempre é possível.

Aos meus irmãos Jeo e Poli por toda compreensão em abrir mão de suas diversões quando eu não poderia participar.

Ao meu noivo Carlos pela paciência e estímulo quando me faltavam. Obrigada ao meu Deus pela experiência acrescida em minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Obrigada ao meu Deus, eu sei que nada é por acaso, tudo tem um propósito. Obrigada, pelo ar que respiro e pelos dias que o Senhor me concedeu de aprendizado e tenho certeza que o amanhã será maravilhoso!

Aos meus pais Marcelon e Ediganeide, por todo exemplo sempre mostrado e abrir os meus olhos para ter a certeza que tudo é com sacrifício, esforço e dedicação, sou grata por abrir mãos de seus sonhos para realizar o meu e de meus irmãos. Obrigada, pai pelas caronas e finais de semanas “perdidos” para estar junto comigo durante o experimento. Palavras não conseguem expressar toda gratidão nesse momento. Essa conquista devo a vocês!

Obrigada Jeo e Poli pelas risadas, distrações, reclamações por não poder assistir muitos filmes com vocês, mas também sei que compreenderam. Amo vocês.

Ao meu noivo Carlos, por suportar meus momentos que eram necessários maiores paciência comigo, por nunca desistir de nós e me fazer acreditar que eu seria capaz.

A minha cunhada Dayane, pelo incentivo e estímulo e me fazer saber que tudo daria certo! Aos meus primos que sempre deram palavras que me ajudaram e me animaram a prosseguir, em especial as minhas primas Ester e Estela pela ajuda no momento certo, tenho certeza que seria mais difícil sem vocês, obrigada pelo incentivo!

Aos meus avós paternos Amaro (in memoria) e Maria, maternos Luiz (in memoria) e Marina amo vocês e sinto falta dos que nos deixaram.

Aos meus tios e tias, em especial tia Edna e tio Iremar pelo incentivo em sempre avançar e nunca desistir.

Aos meus orientadores Ana e Raul por acreditar que eu seria capaz e abrir espaço nos laboratórios, por compartilhar conhecimentos, instruções e horas dedicadas ao meu estudo. Serei eternamente grata e nunca esquecerei pela oportunidade confiada!!

Aos meus amigos Carol e Henrique, vocês fizeram os dias mais leves, divertidos, obrigada pelas experiências trocadas, dúvidas tiradas, e paciência, quero leva-los para sempre na minha vida.

As minhas estagiárias, Dani em especial, o meu carinho, respeito e admiração por você são imensos. A Brenda e Raquel pela ajuda principalmente no treinamento.

Obrigada, Tássia pela ajuda dada e toda explicação, tempo dedicado ao meu estudo, auxílio em todo momento, nunca esquecerei que você também tem parcela

no dia de hoje. Obrigada pelos conselhos e experiências de vida compartilhadas, me fizeram crescer.

Obrigada Diego Lacerda e Manuela pela ajuda dada, principalmente no estágio à docência, aprendi muito com vocês.

A piauiense mais divertida que conheci Luana, você fez os experimentos serem mais tranquilos e divertidos, obrigada pela ajuda e troca de conhecimento, pretendo levar sua amizade para sempre. A minha amiga Michelline, mesmo distante sempre incentivou e apoiou para prosseguir na caminhada.

Aos meninos do laboratório pela troca de conhecimento e conversas da vida principalmente, Carol Cadete, Sabrina, Thaynan, Jacqueline, Diego Visco. Aos professores do grupo por sempre estarem dispostos a ajudar Raquel Aragão, Kelli Ferraz, Antônio e Lígia.

Ao veterinário Dr. França pelo ensinamento, não apenas de manuseio e técnicas desenvolvidas nos animais, mas também pelos conselhos de vida.

As minhas amigas Sanja, Manu e Fabíola que sempre incentivaram, acreditaram e me fizeram ter dias mais leves.

A professora Tâmara, que me mostrou o mundo da experimentação animal e a Raquel Campos pelos ensinamentos.

Ao Programa de Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento pela oportunidade de aprender.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo financiamento do meu projeto.

Eis que farei uma coisa nova, e, agora, sairá à luz; porventura, não a sabereis? Eis que porei um caminho no deserto e rios no ermo (Bíblia, antigo testamento, Isaías 43:19, 2018).

RESUMO

A microcefalia é má formação que crianças nascem com o perímetro encefálico menor do que o recomendado de acordo com a sua idade e sexo. O objetivo da 1ª parte do estudo foi avaliar em animais submetidos a modelo experimental de microcefalia o peso corporal, desenvolvimento somático, aparecimento de características físicas. Foram utilizadas 15 ninhadas oriundas de 15 ratas gestantes (Wistar). A partir daí tivemos 7 ratas do grupo (C) controle e 8 (B) busulfan. Obtivemos resultados como (* $p < 0,05$): Diminuição de todas as medidas murinométricas, atraso na erupção dos incisivos inferiores e superiores, prensão palmar, recuperação de decúbito colocação pelas vibrissas, na queda livre e na geotaxia negativa e abertura ocular. Consideramos que as sequelas encontradas nos animais são também encontradas no ser humano, possibilitando desta forma a extrapolação dos resultados. A 2ª parte do estudo tem como objetivo de avaliar em ratos submetidos a modelo experimental de microcefalia os efeitos de um programa de treinamento físico de resistência dos 35 aos 61 dias de vida pós-natal sobre: atividade locomotora, teste de força, coordenação motora em barras paralelas, rotarod, peso encefálico aos 28 dias, peso dos músculos sóleo e EDL direito e análise do córtex motor aos 28 dias de vida. Os grupos foram compostos de 12 ratas (Wistar) para obtenção dos grupos controle não-treinado (CTN, $n=5$), busulfan não-treinado (BTN, $n=5$), controle treinado (CT, $n=6$), busulfan treinado (BT, $n=5$). Após os teste foi realizado a análise estatística, verificamos atraso no sistema locomotor aos 28 e 62 dias de vida nos animais tratados, menor coordenação motora em barras paralelas nos animais tratados, peso encefálico reduzido aos 28 dias nos animais busulfan, peso corporal menor aos 65 dias de vida nos animais tratados que não realizaram treinamento físico, o peso muscular extensor longo dos dedos demonstrou um aumento da massa muscular nos animais tratados por fim redução da área do neurônio aos 28 dias de vida nos animais busulfan. O treinamento de resistência não foi eficiente no período de 4 semanas, também não mostrou melhora na força muscular e na melhora da coordenação motora dos animais. Verificamos que para uma melhora na qualidade de vida das crianças com microcefalia é necessário um treinamento físico, porém em um período de maior duração.

Palavras-chave: Microcefalia. Treinamento de resistência. Deficiências do desenvolvimento. Atividade locomotora. Desempenho sensório-motor.

ABSTRACT

Microcephaly is malformation that children are born with the brain perimeter smaller than the one recommended according to their age and gender. The objective of the first part of the study was to evaluate in animals submitted to experimental model of microcephaly: body weight, somatic development and appearance of physical characteristics. Fifteen litters from 15 pregnant rats (Wistar) were used. We obtained results as ($p < 0.05$): Decreased all murine measurements, delayed eruption of the lower and upper incisors, palmar grip, recovery decubitus placement by vibrissae, free fall and negative geotaxia and ocular opening. We consider that the sequences found in the animals are also found in humans, thus allowing an extrapolation of the results. The second part of the study aims to evaluate in rats submitted to an experimental model of microcephaly the effects of a physical training program of resistance from 35 to 61 postnatal life on locomotor activity, strength test, motor coordination in parallel bars, rotarod, encephalic weight at 28 days, soleus and right EDL muscles weight, and motor cortex analysis at 28 days of age. The groups were composed of 12 rats (Wistar) to obtain the untrained control groups (CTN, $n = 5$), untrained busulfan (BTN, $n = 5$), trained control (CT, $n = 6$), busulfan (BT, $n = 5$). After the tests, the statistical analysis was performed, we verified delays in the locomotor system at 28 and 62 days of life in treated animals, less motor coordination in parallel bars in the treated animals, reduced brain weight at 28 days in busulfan animals, body weight less than 65 days of life in the treated animals that did not perform physical training, the long extensor muscle weight of the fingers showed an increase in muscle mass in the animals treated by end reduction of the neuron area at 28 days of life in busulfan animals. Resistance training was not efficient in the 4-week period, nor did it show improvement in muscle strength and improvement of the motor coordination of the animals. We verified that for an improvement in the quality of life of the children with microcephaly it is necessary a physical training, but in a period of greater duration.

Key words: Microcephaly. Resistance training. Desenvolvimental disabilities. Locomotion. Psychomotor performance.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ZikV	Zíka vírus
Intergrowth	Estudo Internacional de Crescimento Fetal e do Recém-Nascido
NHP	Primatas não humanos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
EDL	Extensor longo dos dedos
ATP	adenosina trifosfato
MHC	Miosina de cadeia pesada
I.P	Intraperitoneal
S	Segundos
P	Positivo
MM	Mililitro
CEUA	Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco
Consea	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
LENIB	Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
C	Controle
B	Busulfan
MG	Miligrama
CNT	Controle não treinado
CT	Controle treinado
BNT	Busulfan treinado
BT	Busulfan treinado
CM	Centímetro
AVA	Etil venil acetato

G	Grama
M	Metro
M/S	Metro por segundo
J	Joule
MW	Megawatt
RPM	Rotação por minuto
NaCl	Ácido clorídrico
PBS	Tampão fosfato-salina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	MICROCEFALIA EM HUMANOS.....	18
2.2	PLASTICIDADE FENOTÍPICA.....	21
2.3	MICROCEFALIA EXPERIMENTAL.....	23
2.4	DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR EM RATOS.....	25
2.5	ONTOGÊNESE DE REFLEXOS EM RATOS.....	29
2.6	EFEITOS DO TREINAMENTO DE RESISTÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR.....	31
3	HIPÓTESE	35
4	OBJETIVOS	36
4.1	OBJETIVO GERAL DA 1º PARTE DO ESTUDO.....	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA 2º PARTE DO ESTUDO.....	36
4.3	OBJETIVO GERAL DA 2º PARTE DO ESTUDO.....	36
4.4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA 2º PARTE DO ESTUDO.....	36
5	MÉTODO	37
5.1	ANIMAIS DA 1º PARTE DO ESTUDO: MODELO EXPERIMENTAL DE MICROCEFALIA ASSOCIADO A SÍNDROMES CONGÊNITAS: CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DE DANOS NO CRESCIMENTO SOMÁTICO, CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MATURAÇÃO REFLEXA.....	37
5.2	ONTOGÊNESE DE REFLEXO.....	37
5.3	MEDIDAS MURINOMÉTRICAS.....	40
5.4	CARACTERÍSTICAS SOMÁTICAS.....	42
5.5	ASPECTOS ÉTICOS.....	44
5.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS DO ARTIGO.....	44
5.7	ANIMAIS DA 2º PARTE DO ESTUDO: EFEITOS DO TREINAMENTO DE RESISTÊNCIA EM ANIMAIS SUBMETIDOS À MODELO EXPERIMENTAL DE MICROCEFALIA.....	45
5.8	PROGRAMA DE TREINAMENTO DE RESISTÊNCIA.....	46
5.9	ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	47
5.10	ESTUDO DA FORÇA MUSCULAR.....	48

5.11 ESTUDO DA COORDENAÇÃO MOTORA EM BARRAS PARALELAS.....	49
5.12 ESTUDO DA COORDENAÇÃO MOTORA EM ROTAROD.....	49
5.13 PESAGEM E COLETA DE TECIDO.....	50
5.14 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO CÓRTEX CEREBRAL.....	50
5.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	51
6 RESULTADOS	52
6.1 ARTIGO DA 1º PARTE DO ESTUDO ESTÁ DISPOSTO NO APÊNDICE A - EXPERIMENTAL MODEL OF MICROCEPHALY ASSOCIATED WITH CONGENITAL SYNDROMES: CRITERIA FOR EVALUATION OF DAMAGE IN SOMATIC GROWTH, PHYSICAL FEATURES AND REFLEX MATURATION.....	52
6.2 RESULTADOS DA 2º PARTE DO ESTUDO - EFEITOS DO TREINAMENTO DE RESISTÊNCIA EM ANIMAIS SUBMETIDOS A MODELO EXPERIMENTAL DE MICROCEFALIA.....	52
6.3 ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	52
6.4 FORÇA MUSCULAR.....	56
6.5 TREINAMENTO DE RESISTÊNCIA.....	57
6.6 BARRAS PARALELAS E ROTAROD.....	57
6.7 PESO CORPORAL E MUSCULAR.....	58
6.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA ENCEFÁLICA DO CÓRTEX MOTOR.....	60
7 DISCUSSÃO.....	61
8 CONCLUSÃO.....	67
9 REFERÊNCIAS.....	68
APÊNDICE A - EXPERIMENTAL MODEL OF MICROCEPHALY ASSOCIATED WITH CONGENITAL SYNDROMES: CRITERIA FOR EVALUATION OF DAMAGE IN SOMATIC GROWTH, PHYSICAL FEATURES AND REFLEX MATURATION.....	90
APÊNDICE B – OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O MESTRADO (ARTIGO PUBLICADO 1).....	109
APÊNDICE C – OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O MESTRADO (ARTIGO PUBLICADO 2).....	118
ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA.....	127
ANEXO B – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO 1º ARTIGO.....	128
ANEXO C – HISTÓRICO ESCOLAR.....	129

1 INTRODUÇÃO

A microcefalia é uma condição em que a criança nasce com a circunferência da cabeça menor do que o recomendado de acordo com a idade e sexo (Brasil, 2017). A grande maioria dos casos de microcefalia é acompanhada de alterações motoras e cognitivas (Coffito, 2016). O sistema motor é um dos mais prejudicados, onde as crianças apresentam pouco controle cervical, baixo desenvolvimento dos músculos esqueléticos do tronco e/ou membros, encurtamento dos músculos, reflexos alterados, dificuldade de se apoiar para engatinhar, incapacidade em realizar extensão dos dedos e abdução do polegar e em manter a postura sentada (Reis *et al.*, 2018).

Entre os anos de 2000 a 2014, foram registrados pelo Sinasc (sistema de informação sobre nascidos vivos) 2.464 nascidos vivos com microcefalia no Brasil, sendo uma média de 164 casos por ano (Gardia, 2018). Em 2015 foram notificados 4.749 de microcefalia, e desses, 1.161 (24%) foram confirmados (Garcia, 2018). O estudo de Marinho *et al.* (2016), notificou que 71% dos casos de microcefalia notificados foi no Nordeste. De outubro de 2015 até maio de 2017, 26 países das Américas relataram casos confirmados da síndrome causada pelo Zika vírus (ZIKV), neste período, 3.374 casos, 82% ocorreram no Brasil (Albuquerque *et al.*, 2018). No estado de Pernambuco existem 456 casos confirmados de microcefalia por ZIKV (Brasil, 2018). Após este ano, o nascimento de crianças com microcefalia cresceu associados aos casos de infecção de mulheres grávidas pelo ZIKV, (Petersen, *et al.*, 2016).

Com isso, começou-se a estreitar a relação do vírus e a microcefalia (Petersen, *et al.*, 2016). Foi confirmada em 2015 que o vírus é capaz de atravessar a barreira placentária e infectar o feto (Miner, 2015). A infecção pelo ZIKV se dá tanto pela picada como pela relação sexual, uma vez que o ácido ribonucleico do vírus pode permanecer até 188 dias no sêmen após o início dos sintomas (Barzon *et al.*, 2016). Também ocorre contaminação através da saliva, urina e transfusão de sangue (Ma *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016; Musso *et al.*, 2015; Gourinat, *et al.*, 2015; Musso *et al.*, 2014b). Desta maneira, visto o repentino aumento dos casos de microcefalia resultantes da infecção pelo ZIKV e a facilidade de disseminação do mesmo, muito esforço tem sido empregado na tentativa de reduzir o surgimento de novos casos. Além disso, uma população de indivíduos portadores da microcefalia necessita de

cuidados especiais. Com o intuito de assegurar maior conhecimento acerca das consequências da microcefalia, bem como medidas terapêuticas para as sequelas motoras, de modo a melhor assessorar esta população, torna-se necessário a realização de estudos com modelos experimentais de microcefalia.

Além da contaminação pelo ZIKV, outros agentes exógenos podem induzir a microcefalia, como: agentes infecciosos (vírus, protozoários), agentes físicos (radiação, hipertermia), drogas ilícitas (maconha, cocaína, heroína) e agentes químicos (álcool, cigarro, mercúrio, chumbo, medicamentos) (Sadler, 2005). Dentre os agentes químicos existe o busulfan, um agente alquilante utilizado no tratamento de leucemia mielóide crônica e quando usado no período gestacional em humanos, causa a microcefalia (Bishop e Wasson, 1986). Assim, ele é um teratogênico indutor de microcefalia (Nagai, 1972; Kasuga e Takahashi, 1986). Com isso, o busulfan tem sido usado como ferramenta na indução da microcefalia experimental, permitindo comparação da má formação entre humanos e ratos (Furukawa *et al.*, 2007). Segundo Furukawa e colaboradores, o busulfan quando administrado durante a gestação, acarreta morte neuronal e distúrbios na migração celular, sendo estes os eventos subjacentes à gênese da microcefalia (Furukawa *et al.*, 2007). Sabe-se que a gestação é um período crítico do desenvolvimento encefálico envolvendo eventos como proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose (Rice e Barrone, 2000), que são muito sensíveis a interferências ambientais (Barker *et al.*, 1991).

Existem estudos epidemiológicos e experimentais demonstrando que alterações no meio ambiente e no início da vida podem levar às variações fenotípicas com modificações permanentes no metabolismo, estrutura e função dos sistemas fisiológicos (Barker *et al.*, 1991; Toscano *et al.*, 2008; Lacerda *et al.*, 2017). Atualmente, vem sendo muito pesquisado no campo da neurociência o desenvolvimento biológico humano. Acredita-se que o cérebro está sempre em processo de alteração e que habilidades não desenvolvidas ou perdidas, podem de certa forma se recuperar na idade adulta (Rocha & Rocha, 2000; Goswami, 2004). O estabelecimento do fenótipo nos mamíferos tem na fase pré e pós-natal um período vulnerável a múltiplos fatores ambientais (Gluckman, 2004). Portanto, alguns pesquisadores o consideram “preditor” de consequências que irão se manifestar a curto ou a longo-prazo, inclusive na vida adulta (Barker, 1991; West-Eberhard, 1986). Com isso, surge o conceito de plasticidade fenotípica, onde um genótipo

pode expressar-se de modo diverso a depender da particular interação com o meio ambiente, revelando a capacidade de um organismo reagir aos desafios impostos pelo ambiente, modificando a sua forma, estado, movimento ou padrão de atividade (West-Eberhard, 1986).

O treinamento físico nas doenças neurológicas promove hipertrofia nas fibras musculares, aumento de tamanho mais evidente nas fibras do tipo II que nas fibras do tipo I (Fleck *et al.*, 1999), com consequente aumento do volume e o número de células, e repercutindo o aumento de força e resistência e também melhora coordenação e equilíbrio dos indivíduos (Amengual, 1992). Acredita-se que exista uma plasticidade neural (capacidade de organização do Sistema Nervoso frente ao aprendizado e a lesão) pelo fato do sistema neural se adaptar na fase inicial do treinamento de força, também ocorrer aumento da unidade motora e sincronização da descarga de unidade motora (Fleck *et al.*, 1999). Antigos estudos mostram que o treinamento de força, causando hipertrofia muscular, poderia prejudicar os padrões normais do movimento, porém, estudo recente tem comprovado os benefícios do treinamento de força, como sensação de bem-estar, e impacto positivo na musculatura esquelética (Ferreira *et al.*, 2009). Como na microcefalia o sistema motor é um dos mais acometidos, dotando seu portador de deficiências motoras e posturais, o treinamento físico no indivíduo jovem pode apresentar um potencial terapêutico para algumas das sequelas motoras. Entretanto, a abordagem da microcefalia experimental associadas com treinamento físico é escassa na literatura. Com isso, o objetivo da 1ª parte do estudo foi a indução da microcefalia em ratos wistar, fazendo uso do busulfan durante a gestação, seguidos do acompanhamento das características físicas, maturação somática e sensório-motora, além da ontogênese de reflexos, como medidas para se identificar a microcefalia experimental.

Os resultados obtidos compuseram o artigo original intitulado (Experimental model of microcephaly associated with congenital syndromes: Criteria for evaluation of damage in somatic growth, physical features and reflex maturation) submetido a revista Neurotoxicology and Teratology. Uma vez identificado a microcefalia e danos associados em ratos foi desenvolvido uma segunda parte, os animais foram submetidos ao treinamento de resistência diária, seguido de avaliação da condição motora; atividade locomotora, força muscular. Os resultados obtidos compuseram o segundo artigo original, intitulado (Efeitos do treinamento de resistência em animais

submetidos a modelo experimental de microcefalia), a ser submetido na revista (Journal of Strength and Conditioning Research).

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Bioquímica - LENIB do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, orientado pelos professores Ana Elisa Toscano de Meneses da Silva Castro e Raul Manhães de Castro.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICROCEFALIA EM HUMANOS

A microcefalia é um achado clínico em que a criança nasce com uma redução da circunferência occipital-frontal (Woods, 2004). A maioria das crianças apresentam diminuição do córtex cerebral e deficiência cognitiva (Woods, 2004; Wood, 2004). A microcefalia é dividida em primária e secundária (Woods, 2004). A primária ocorre durante a gestação e apresenta redução de neurônios (Woods, 2004). A grande formação de neurônios é gerada na 21ª semana de gestação, período em que ainda não tem acontecido com grande abundância a conexão dendrítica e mielinização e só acontecerá após o nascimento (Woods, 2004). A secundária ocorre após o nascimento, com redução da conexão de dendritos (Woods, 2004).

O diagnóstico para microcefalia até 2015 era de 33 cm do perímetro cefálico (Brasil, 2016). O Ministério da Saúde (MS) verificou que abrangia muitas crianças sem microcefalia fazendo-as passar por exames de imagens (ressonância magnética e tomografia), causando estresse aos seus familiares e as crianças (Brasil, 2016). Então foi reduzido o critério para 32 cm em ambos os sexos durante o período de 13 de dezembro de 2015 a 12 de março de 2016 (Brasil, 2016). Só a partir do dia 13 de março de 2016 foi adotada a recomendação feita dias anteriores pela Organização Mundial de Saúde aos profissionais de saúde para avaliar as crianças nascidas a termo até 24 horas após o nascimento e dentro da primeira semana de vida (6 dias e 23 horas) (Brasil, 2016). O diagnóstico de microcefalia acontece quando o resultado do perímetro cefálico for -2 desvios padrão abaixo da média ou 31,5 para meninas e 31,9 para meninos de acordo com a idade e sexo (Brasil, 2016). Crianças com desvio padrão -3 são classificadas como microcefalia grave (Brasil, 2016). Para recém-nascidos prematuros, o MS indica utilizar como referência a idade gestacional segundo a tabela do Estudo Internacional de Crescimento Fetal e do Recém-Nascido: Padrões para o Século 21 (Intergrowth) (Brasil, 2015; Villar *et al.*, 2014).

A causa dessa má formação pode ser por fatores genéticos ou ambientais, como o consumo de bebidas alcóolicas durante a gestação, infecção pelo ZIKV, sífilis, rubéola, citomegalovírus, ter o peso corporal baixo, irradiação, diabetes mal controlada, dentre outros insultos. (Krauss, 2003; Lo Tym, 2003; Brasil, 2016; Miner,

2016; Araújo, 2016). As infecções secundárias também contribuem para a etiologia da microcefalia e podem ocorrer devido a fatores genéticos ou adquiridos por infecções, por exemplo, pelo ZIKV, meningites, encefalites e pode ser por intoxicação por cobre e falência renal (Linden, 2016; Brasil, 2016).

O período gestacional em que a mãe é infectada tem ligação direta com as consequências intracranianas que o bebê terá (Nunes *et al.*, 2016). Quanto mais precoce (1º trimestre de gestação), mais grave será a consequência, e quanto mais tardiamente, mais branda será a sequela (3º trimestre) (Nunes *et al.*, 2016). O ZIKV tem a capacidade de atingir células progenitoras neurais e células da glia no cérebro que está em desenvolvimento e como consequência ocasiona morte celular e redução da proliferação de células progenitoras (Wen *et al.*, 2018). Ainda é necessário mais estudos para compreensão melhor do acometimento cerebral (Wen *et al.*, 2018).

Sabe-se que o ser humano por ser bípede se locomove com fases de apoio unipodal, sem nenhum contato, ou permanece parado com o contato de ambos os pés (ortostatismo) (Winter, 1995). A principal interação que o ser vivo tem com o ambiente se dá através da locomoção (Garland *et al.*, 2011). Existem itens ligados à locomoção que constituem elementos importantes para sobrevivência, sendo eles: a busca por alimentos, a fuga de um predador ou a reprodução sexual (Garland *et al.*, 2011). Para isso, é necessária uma coordenação precisa, obtida através da maturação e integração funcional dos sistemas nervoso e muscular (Barros *et al.*, 2006). O sistema nervoso está envolvido com a coordenação e controle da ação motora, e o sistema muscular com a geração de força mecânica para permitir o deslocamento do corpo (Barros *et al.*, 2006). Dentre as anormalidades neurológicas na microcefalia, encontram-se hipertonia global grave (rigidez muscular normal) com hiper-reflexia reversa, irritabilidade, hiperexcitabilidade, choro excessivo, distúrbio de deglutição, além de respostas auditivas e visuais comprometidas (Eickmann, 2016). Observa-se que algumas crianças no período neonatal já apresentam crises convulsivas e ao longo da vida as frequências das crises aumentam, porém é observado na maioria das vezes a partir do terceiro mês, crises epiléticas e mais comumente com espasmos (Eickmann, 2016).

Exames de imagem mostraram que crianças com microcefalia específica diferem das outras crianças com alterações neurológicas provocadas por outros agentes, tais como calcificação difusa, puntiformes e predominantes na junção

córtico-subcortical (Aragão *et al.*, 2016), sem a área do lobo frontal capaz de planejar, organizar e executar os movimentos (Andrade *et al.*, 2009). Existem outras áreas que também tem o papel na hora de participarem da ação motora, enviando mensagens, dosando a força, a agilidade, fornecendo feedback visual, tátil e auditivo, permitindo desta forma o ajuste constante do movimento (Kolb e Whishaw, 2002). Na região frontal, o movimento acontece primeiramente com a intenção de movimento, um planejamento elaborado no córtex pré-frontal; e em seguida a informação vai para a área pré-motora (que fica entre o lobo pré-frontal e a área motora) que organiza a sequência motora; logo depois ela vai para a área motora primária (que fica no giro pré-central) que enviará os impulsos para os músculos a pôr fim executar o movimento planejado (Andrade *et al.*, 2004). Paralisia dos neurônios motores inferiores causa paralisia flácida, com diminuição dos reflexos e do tono muscular e atrofia muscular neurogênica rápida (Riet-Correa, *et al.*, 2002) Essas sequelas podem ainda se espalhar até o tronco encefálico, núcleos da base e região periventricular, com comprometimento da migração neural, além de dilatação ventricular e atrofia de tronco que também está envolvido, com a marcha, ou do cerebelo e disgenesia do corpo caloso (Aragão *et al.*, 2016). Poucos pacientes demonstraram problemas ósseos, como rigidez e artrogripose (quadril, joelho e tornozelo) e pés tortos congênitos (Ventura *et al.*, 2016). Anormalidade ocular como atrofia macular, alteração na retina, no nervo óptico e nistagmo horizontal (Ventura *et al.*, 2016). Alterações cardíacas e renais (Angelidou *et al.*, 2018). Diante de todas as sequelas que a microcefalia provoca, é necessário identificar que com a melhoria das alterações motoras (tendo em vista que a maioria apresenta artrogripose) a qualidade de vida também melhora (Duarte *et al.*, 1995).

O busulfan foi estudado pela primeira vez por cientistas que perceberam sua atividade em relação a carcinoma de ascites murinas (Buggia *et al.*, 1994). Foi comprovada sua eficaz em leucemias linfocíticas agudas e crônicas. Em 1953, Galton observou uma ação antitumoral significativa em pacientes crônicos com leucemias mielógicas, e a partir daí o busulfan tornou-se a terapia tradicional no tratamento desta doença (Galton, 1953). Agentes alquilantes utilizados no tratamento da leucemia mielóide crônica trazem não apenas melhora da patologia que o indivíduo possui, mas utilizado num período crítico, pode promover perda de massa muscular esquelética grave que está associada à ativação de NF- κ B, com

atrofia muscular (Damrauer *et al.*, 2018). Estudos realizados com roedores verificaram que o exercício traz benefícios para a caquexia e a sarcopenia são benéficos (Hiroux *et al.*, 2016; Coletti *et al.*, 2013). Mecanismos ligados aos efeitos benéficos do treinamento contra a caquexia incluem a regulação do fluxo autofágico (Pigna *et al.*, 2016), a redução da expressão de Pax7 em células satélites (Coletti *et al.*, 2018), e a liberação de Hsp60 das células musculares (Barone *et al.*, 2016). Visto que com a fraqueza muscular ocorre desmineralização óssea com consequente debilitação de força, equilíbrio e menor autonomia para as atividades da vida (Pierine *et al.*, 2009). Doses altas de busulfan são capazes de provocar esclerose de veias centrais e também neutropenia tanto em crianças como em adultos (Buggia *et al.*, 1994).

2.2 PLASTICIDADE FENOTÍPICA

A plasticidade fenotípica pode trazer repercussões ao longo da vida. (Kandel *et al.*, 2003; Whishaw, 2002; West-Eberhard, 1986). O período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso central baseia-se em processos organizacionais mais modificáveis de forma favorável ou desfavorável (Scott, 1986), nos primeiros anos da vida, quando o cérebro da criança está muito susceptível a estimulação sensorial para o amadurecimento de sistemas neurais mais desenvolvidos (Dobbing, 1970). Entende-se com isso que distúrbios neurológicos ocorridos no período crítico podem ser causados devido a insultos externos (Bax *et al.*, 2005), como é o caso de microcefalia e paralisia cerebral que, são inclusos na classificação de transtornos neurológicos (Yeargin-Allsopp *et al.*, 2008). Entretanto, os seres vivos também possuem a capacidade de reagirem com adaptações neuroquímicas e morfofisiológicas aos distintos insultos do meio ambiente. Esta capacidade tem se mostrado importantíssima na maioria das espécies animais e vegetais, por possibilitar a sobrevivência e a reprodução (West-Eberhard, 1986). Costumeiramente encontra-se a relação determinante entre a vida intrauterina, as condições de saúde no nascimento e no período neonatal, e os problemas crônico-degenerativos na vida adulta (Brasil, 2012). Dentre esses problemas destaca-se obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares (Barker *et al.*, 1991), esquizofrenia (Prata, 2014) e depressão (Krause *et al.*, 1991).

Estudos mostraram que agressões ambientais como a desnutrição durante os períodos críticos do desenvolvimento modificaram o fenótipo muscular e as propriedades biomecânicas do músculo em curto e longo prazo (Toscano *et al.*, 2008; Toscano *et al.*, 2010; Aragão *et al.*, 2014; Ferraz-Pereira *et al.*, 2015), com diminuição da quantidade e proporções de fibras musculares (Toscano *et al.*, 2008). As mudanças diminuem a massa do músculo devido à redução da quantidade de miofibrilas e redução de fibras por músculo, causando hipotrofia (Lara, 2003).

Em virtude disso, têm sido investigados em estudos experimentais, os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de sequelas físicas observados em distúrbios neurológicos (Strata *et al.*, 2004). Neste contexto, existem alguns modelos experimentais da paralisia cerebral e microcefalia em ratos que tentam reproduzir os danos causados por essa sequela, permitindo, dentro dos devidos limites, a extrapolação para humanos (Johnston *et al.*, 2006). Tais modelos vêm contribuindo na construção de potenciais terapias que visam minimizar a incapacidade crônica de transtornos neurológicos (Oliveira, 2009). A associação entre respostas adaptativas do organismo frente a um estímulo ambiental é denominada de plasticidade fenotípica e possivelmente ocorre por mecanismos epigenéticos (Sinclair *et al.*, 2007; West-Eberhard, 2003).

Em 1940 surgiu o conceito de epigenética, com o biólogo Conrad Waddington, correspondendo a uma série de modificações moleculares na cromatina do DNA (Waddington *et al.*, 1942). Essas modificações químicas que acontecem no DNA são rotineiramente feitas e desfeitas ao longo da vida do ser humano, menos para marcações químicas que são heranças genéticas, visto que frequentemente os indivíduos entram em contato com agentes promotores desses fenômenos na vida (Howell *et al.*, 2009; Jirtle *et al.*, 2007). Com isso, mudanças epigenéticas podem manifestar-se no genoma de um indivíduo em qualquer fase da vida, podendo desenvolver ou não determinadas patologias.

Pesquisa indica que estresse no período gestacional ou no início da vida pode aumentar o risco de doenças neurológicas e psiquiátricas, principalmente via regulação epigenética alterada (Bobenko *et al.*, 2015). Existe um grande interesse entre treinamento de resistência e epigenética, porém existem poucos estudos que fazem essa ligação, sendo cada vez mais necessário a otimização deste assunto com os profissionais (Lobo *et al.*, 2018).

2.3 MICROCEFALIA EXPERIMENTAL

O cérebro se desenvolve rapidamente no final da gestação e pode estar mais propenso a exposição teratogênica (Jerônimo *et al.*, 2008). Desordem na migração neural é uma das principais causas de microcefalia experimental (Szabo, 1986). Durante a descoberta inicial do ZIKV, estudos em animais NHP (Primatas não humanos) (*Cercopithecus aethiops centralis*, *M. mulatta* e *C. ascanius schmidtii*), ratos e outros roedores (exemplo: ratos de algodão -*Sigmodon hispidus*), porquinhos-da-índia (*Cavia porcellus*) e coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) demonstrou resultados ambíguos, com alguns animais manifestando sinais clínicos com uma febre que acontecia rapidamente até erupção cutânea chegando à morte dos animais (Dick, 1952; Chan, 2015; Julander, 2016; Zompi, 2012). Estudos iniciais do vírus mostraram que a Zika é neurotrópico (Dick *et al.*, 1952; Bell, 1971).

Acreditava-se que devido ao período de gestação ser diferente entre mulheres e ratos, os animais não conseguem reproduzir as sequelas do ZIKV, o cérebro tão reduzido como o que é encontrado em humano (Cugola *et al.*, 2016). Porém, após análise mais detalhada verificou-se malformações corticais nos animais sobreviventes, com número reduzido de células e espessura da camada cortical, sinais encontrados na microcefalia em humanos (Cugola *et al.*, 2016).

Em nível celular, foi verificado que o ZIKV provoca diminuição no número de neurônios do córtex, tálamo e hipotálamo (Cugola *et al.*, 2016; Miner *et al.*, 2016). Esta morfologia foi caracterizada por núcleos vacuolares e por apresentação de padrão de cromatina marginalizado com fragmentos nucleares, sugerindo morte celular por apoptose e autofagia em curso como também anormalidades oculares (Cugola *et al.*, 2016; Miner *et al.*, 2016). Neurônios e astrócitos no cérebro de camundongos podem estar infectados, induzindo degeneração do hipocampo e necrose de células piriformes 7 dias após a infecção do ZIKV (Bell *et al.*, 1991). Também é visto osteoartrite dificultando a locomoção (Leite *et al.*, 2015).

Outro indutor de microcefalia experimental é o etanol (Jerônimo *et al.*, 2008). O seu consumo no período pré-natal pode acarretar efeitos físicos, comportamentais, cognitivos e psicossociais (Tacon *et al.*, 2017). De acordo com a classificação do CDC (Centers for Disease Control and Prevention) fetos expostos ao álcool podem ter mudanças relacionadas a defeitos físicos, desordens de neuro desenvolvimento e síndrome alcoólica fetal, a qual é a forma mais grave (Tacon *et*

al., 2017). Estudos clínicos em experimentação animal com ratos expostos ao álcool durante a gestação demonstraram que o etanol causa rupturas no cérebro, promovendo alterações na neurogênese (Tacon *et al.*, 2017). Os neurônios se tornam mais frágeis, diminui o número de células granulares e diminuiu a espessura do córtex (Bolbanabad, 2017). O álcool também vai atuar sobre o cerebelo, sendo o responsável pela ataxia cerebelar e efeitos neurodegenerativos graves (Bolbanabad, 2017). Dificuldade de coordenação motora fina (Kodituwakku, 2009), irritabilidade, hiperexcitabilidade, hipersensibilidade, hipotonia, tremores, tensão muscular com opistótono (Jones *et al.*, 2003). Jerônimo *et al.* (2008), observaram que a exposição ao álcool no período crítico de desenvolvimento da prole, indo da gestação ao desmame os ratos tendência a desenvolver a microcefalia e atraso na migração celular.

A nutrição também pode ser indutora da microcefalia. Animais que passaram pelo período crítico de desenvolvimento em restrição de proteínas, apresentaram redução do crescimento do cérebro podendo desenvolver algumas alterações fisiológicas como a microcefalia e alterações motoras (Dobbing e Sands, 1971), como: perda de fibra muscular tipo II diminuição do diâmetro das fibras musculares, baixa atividade oxidativa, proliferação de tecido intersticial e edema (Oliveira *et al.*, 1999). Quando ocorre a recuperação nutricional após o parto, os filhotes que passaram pela desnutrição na fase intrauterina apresentam filhotes com comprometimento do tecido muscular, diminuição de fibras tipo II, diminuição do diâmetro das fibras musculares, baixa atividade oxidativa, presença de aumento de espaço intersticial, aumento de necrose, mas sem edema (Oliveira *et al.*, 1999).

Robert *et al.*, (2000) observaram que um determinado dia que surgiu no meio de uma colônia inata de ratos Wistar, ratos *flathead* (*fh*). Os animais nasceram com o cérebro tipicamente achatado apresentam ataxia e o crânio achatado (Robert *et al.*, 2000). A mutação desta espécie é apenas cerebral, alterando o crescimento normal do cérebro (Robert *et al.*, 2000). Acredita-se que este fenômeno do crescimento anormal do cérebro é devido a uma grande explosão de morte celular apóptica que ocorre em todo o sistema nervoso central e antes desta ataxia o tamanho do cérebro é normal (Robert *et al.*, 2000).

A utilização de alguns fármacos durante o período crítico do desenvolvimento também promove disfunções fisiológicas características da microcefalia (Furukawa *et al.*, 2007; Bispo e Wassom, 1986). Dentre os agentes farmacológicos indutores

destaca-se o Busulfan, um agente alquilante bifuncional que vem sendo usado para o tratamento de leucemia mieloide crônica e como condicionamento mieloablativo antes do transplante de célula-tronco (Oakhill *et al.*, 1981; Fauroux *et al.*, 1996; Vassal 1990).

O Busulfan apresentou potenciais teratogênicos e citotóxicos (Bispo e Wassom, 1986). Seu mecanismo de ação está baseado na clivagem das ligações alquil-oxigênio da molécula, produzindo um composto eletrofílico que forma ligações cruzadas entre as fitas de DNA. O fármaco causa problemas na duplicação do DNA e transcrição do RNA, causando o impedimento da divisão celular. Sua citotoxicidade está intimamente relacionada com esse efeito de alquilação, pois como sua atividade não depende da síntese de RNA, o busulfan pode afetar células que estão em qualquer fase do ciclo celular (Sikic, 2005). Estudos com Busulfan em ratas gestantes apresentaram filhotes com microcefalia e microftalmia acompanhada de hipoplasia na retina e catarata na lente ocular. (Furukawa *et al.*, 2007; Ohira *et al.*, 2013). Busulfan é capaz de causar lesões hipotatológicas sistêmicas (Ohira *et al.*, 2009) e ao sistema nervoso central caracterizada por lesões neuronais e apoptoses de células progenitoras (Ohira *et al.* 2013). O fármaco também é tóxico para células ovarianas e testiculares com diminuição de células germinativas em ratos. O Busulfan também é capaz de induzir anoftalmia, microtia, microabdômen, oligodactilia, micromelia, cauda curta, braquidactilia, anasarca, dentre outras sequelas em ratos e camundongos (Nagai, 1972). Não existem relatos de desordem motoras em animais expostos ao busulfan.

2.4 DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR EM RATOS

O desenvolvimento neuromotor em ratos evolui rapidamente no período de lactação (Jamon, 2006). Durante a primeira semana de vida, os ratos são capazes de rastejar e girar, no final da segunda semana desenvolve a capacidade de resistir à gravidade (Jamon, 2006). Por fim, na terceira semana conseguem caminhar (Jamon, 2006).

Sendo assim, o rato desenvolve uma adaptação aos sistemas que controlam o equilíbrio, fazendo com que ocorra de forma contínua, informações necessárias sobre a posição e o movimento de todas as partes do corpo (Winter, 1995). Este

controle também requer uma ligação entre o cognitivo e o motor, estando relacionados aos recursos atencionais, funções executivas e aos sistemas sensorial e músculo esquelético (Ruchinskas *et al.*, 2000). Assim, a locomoção depende da funcionalidade desses processos sob a ligação de estruturas cerebrais superiores que costumeiramente encontra-se com problemas nas doenças neurológicas (Waite *et al.*, 2005).

A marcha normalmente começa quando o calcanhar do membro de referência faz contato com a superfície do solo. O ciclo da marcha termina quando o calcanhar do mesmo membro faz contato com o solo novamente (O'Sullivan, 2004). Moreira e Russo (2004) relataram que na marcha hemiparética normalmente observa-se flexão do membro superior com extensão do membro inferior do hemicorpo acometido. Como consequência, temos uma perna que não consegue suportar completamente o peso durante a fase de apoio, além de não se projetar para frente durante a fase de balanço, a não ser como um todo em circundação (Moreira e Russo, 2004).

O avanço da neurociência, o conhecimento e compreensão da neurofisiologia, juntamente com o surgimento de novas teorias do aprendizado, controle motor e a compreensão da neuroplasticidade são consideradas as bases das quais se apoiam os processos de aprendizagem e controle motor (Brasil, 2016). O aprendizado motor, o controle motor e a neuroplasticidade são o resultado da interação indivíduo com o ambiente e a tarefa (Brasil, 2016).

Diante das alterações motoras que se conseguem mensurar, temos a modificação de aquisição de marcos do desenvolvimento, redução do tamanho da passada, aumento do ângulo do pé e prejuízo em habilidades motoras (Marcuzzo *et al.*, 2008; 2010). Marcuzzo *et al.* (2008), encontraram em ratos com distúrbios neurológicos, redução da área muscular e aumento da densidade de fibras, além de modificações encefálicas como a redução de neurônios do córtex somatossensorial (Marcuzzo *et al.*, 2008).

Os músculos são morfologicamente, constituídos de fibras musculares constituídas por estruturas repetidas, os sarcômeros, sendo estes componentes contráteis fundamentais das fibras musculares (Ma, 2001). Cada sarcômero é formado por várias proteínas, dentre elas as proteínas contráteis miosina (filamento grosso), tropomiosina, troponina e actina (filamento fino), além das proteínas

estruturais, responsáveis pela organização e integridade funcional do sarcômeros (Ma, 2001).

A contração muscular ocorre através da interação entre a actina e a porção globular da molécula de miosina, após a hidrólise do ATP (adenosina trifosfato), pela miosina ATPase (mATPase) (Ma, 2001). Existindo assim uma relação direta entre a velocidade de contração de um músculo e a atividade da mATPase, da porção globular da miosina (Talmadge e Roy 1993). Isto foi demonstrado em análises de fibras isoladas, que revelaram uma alta correlação entre o tipo de fibra, baseado na atividade da mATPase, com a especificidade da miosina de cadeia pesada (MHC) (Pette, 2001). Existem alterações secundária ao distúrbio motor, alterações no comprimento e/ou estrutura nas fibras rápidas que são as seguintes IIa, IIb e IIc (x) sendo a IIb a mais rápida (Pette, 2001).

A composição do músculo em relação aos diferentes tipos de fibras depende da função do músculo (Delp e Duan, 1996). Músculos posturais como, por exemplo, o músculo sóleo, possui maior proporção de fibras de contração lenta (tipo I), oxidativas e resistentes à fadiga (Delp e Duan, 1996). Os músculos envolvidos em atividades rápidas e que exigem força, como por exemplo, extensor longo dos dedos (EDL), possui maior quantidade de fibras de contração rápida (tipo II) altamente fatigáveis (Delp e Duan, 1996).

A fibra IIa é uma fibra rápida intermediária, possuindo potencial moderadamente desenvolvido para geração de força (Piovesan, 2009). A mesma utiliza tanto o metabolismo oxidativo como o glicolítico para a produção de energia durante a contração muscular, sendo considerada fibra rápida, porém com certa resistência à fadiga (Piovesan, 2009). A fibra IIb utiliza predominantemente o metabolismo glicolítico para a produção de energia, sendo mais rápida, porém mais fatigável que a IIa (Piovesan, 2009).

No período pós-natal de ratos foi verificado que os músculos rápidos e lentos apresentam quantidades de fibras rápidas e lentas parecidas antes de iniciar a diferenciação (Ishihara e Tagachi, 1991). Na primeira semana pós-natal, o músculo sóleo possui quase metade é constituído de fibras rápidas, e após um ou dois meses diminui cerca de 10% (Wigston e English, 1992). Do 8º ao 75º dias pós-natal houve aumento de fibra tipo I no músculo sóleo, diferente do EDL que diminui do 8º ao 21º dia pós-natal (Punkt *et al.*, 2004). Os subtipos só foram vistos no 21º dia de vida. (Punkt *et al.*, 2004).

Diferentes métodos podem ser utilizados para análise da atividade locomotora nestes animais, dentre eles, o campo aberto (análise observacional ou automática) é o mais comumente utilizado (Aragão, 2011). Indivíduos com distúrbios neurológicos como a paralisia cerebral tendem a apresentar maior cansaço, fadiga muscular e ineficiência da marcha, causando perda de deambulação (Stigger e Cols, 2011).

O músculo sóleo de animais submetidos à paralisia cerebral experimental apresentou maior número de fibras tipo II e redução das fibras tipo I (Stigger e Cols, 2011). Sabe-se que o músculo sóleo está relacionado à postura, apresentando maior quantidade de fibras tipo I (Stigger e Cols, 2011). Entretanto, após longo período de desuso, o músculo apresenta nítidas mudanças dos tipos das fibras (Stigger e Cols, 2011). Existe uma ligação direta entre o aumento do cansaço e da fadiga muscular com a maior distribuição de fibras tipo II no músculo de indivíduos com paralisia cerebral, visto que esta fibra é mais rápida e, portanto, mais fatigável que as fibras do tipo I (Stigger e Cols, 2011). Com isto, ocorre uma perda da deambulação com redução da distância percorrida e da velocidade média nestes animais, independente do estado nutricional (Oliveira, 2016).

Animais que sofreram alterações neurológicas no período crítico de desenvolvimento apresentam padrões de marcha anormais (como elevação das patas traseiras e extensão anormal dos joelhos e tornozelos durante a marcha) (Marcuzzo e Cols, 2008). Além disso, apresenta redução do comprimento da passada pelo aumento do ângulo do pé e redução de movimentos articulares (Marcuzzo e Cols, 2008).

A microcefalia causa alterações (Eickmann, 2016) na coordenação da marcha com efeito crucial no desenvolvimento da atividade locomotora dos animais que apresentaram alterações neurológicas anteriormente induzidas, reduzindo a distância percorrida por eles (Marcuzzo e Cols, 2008). Crianças portadoras de sequelas deste distúrbio neurológico tendem a apresentar inúmeras anomalias, dentre as sequelas existe a hipertonía global grave (rigidez muscular global) com hiper-reflexia reversa, que resulta na dificuldade de locomoção (Eickmann, 2016).

Distúrbios motores causam nos indivíduos mudança na sensação, percepção, cognição, comunicação, comportamento (Bax *et al.*, 2005) e alterações orofaciais, como é o caso de crianças com paralisia cerebral (Lacerda, 2017). Além disto, secundariamente, podem ocasionar distúrbios musculoesqueléticos como contraturas e deformidades (Bax *et al.*, 2005).

2.5 ONTOGÊNESE DE REFLEXOS EM RATOS

O desenvolvimento neuropsicomotor é um processo sequencial, contínuo e que apresenta íntima relação com a idade cronológica do indivíduo, pelo qual se adquire habilidades motoras, que evoluem de movimentos simples e desorganizados para habilidades motoras altamente organizadas e complexas (Flor *et al.*, 2017). Diversos fatores podem colocar em risco o curso normal do desenvolvimento com interação entre o ser vivo e o meio ambiente através de receptores sensíveis aos diferentes estímulos do meio externo e do meio interno (Berg, 1994).

Impactos durante o desenvolvimento do sistema nervoso central traz prejuízos severos tendo em vista que os eventos celulares estão acontecendo com maior vulnerabilidade (Noback e Eisenman, 1981). As alterações que o atuam podem alterar a estrutura e a função dos processos de desenvolvimento relacionados à idade, como a maturação da maioria das respostas reflexas e respostas motoras (Noback e Eisenman, 1981). Durante a gestação e o período de amamentação do rato, o crescimento e o desenvolvimento do sistema nervoso central ocorrem com grande intensidade (Morgane *et al.*, 1993).

O desenvolvimento neuropsicomotor atípico nem sempre está ligado à presença de alterações neurológicas ou estruturais (Marinho *et al.*, 2016). Crianças com esse mau desenvolvimento, merecem atenção e ações específicas diante de possíveis problemas de coordenação e controle do movimento que podem durar até a fase adulta, e com isso trazem atrasos motores frequentemente associados a prejuízos secundários de ordem psicológica e social que dificultam a socialização de crianças e o seu desempenho escolar (Marinho *et al.*, 2016).

Durante o início da vida, existem determinadas funções que aparecem e desaparecem e que apresentam ligação com a evolução do sistema nervoso central (Brasil, 2016). Tais funções são reflexas e logo evoluem para complexas e voluntárias (Brasil, 2016). Algumas atividades que se mostram presentes ao nascimento são inibidas neste período, tornando-se atividades automatizadas em nível superior do sistema nervoso central (Diament *et al.*, 2005).

Todos os seres vivos aumentam de tamanho a partir do momento que nascem indo ao máximo de acordo com a espécie de cada um (Morgane *et al.*, 1993). Porém, nem todos crescem como o esperado, devido a insultos ambientais ou outros insultos como, por exemplo, epigenético, no período crítico de

desenvolvimento (Morgane *et al.*, 1993). Para isso, existem parâmetros com a finalidade de acompanhar o seu desenvolvimento (Fox, 1965 e Silva *et al.*, 2005). No caso de ratos existe a avaliação sensório-motora, ontogênese de reflexos e desenvolvimento somático (Fox, 1965 e Silva *et al.*, 2005). A maturação dos reflexos indica que houve desenvolvimento do sistema nervoso (Fox, 1965).

Várias evidências experimentais comprovaram que insultos ambientais são capazes de atrasar a maturação dos reflexos e diminuir os fatores murinométricas (Dobbing e Sands, 1971; Cadena-Burbano *et al.*, 2017; Vasconcelos, 2012). Vários reflexos acontecem um após o outro, demonstrando a maturação do sistema nervoso central (Fox, 1965; Smart e Dobbing, 1971). O circuito neural da medula espinhal está envolvido nas ações mais simples dos reflexos (Fox, 1965; Smart e Dobbing, 1971). Diversos reflexos medulares ocorrem pelas fibras nervosas ascendentes sensitivas que possuem a função de levar a níveis superiores as informações obtidas, como acontece na parte superfície do corpo, principalmente, tronco e membros ou em órgãos internos (Nicholls *et al.*, 1992). Diferente das fibras nervosas ascendentes, as fibras nervosas descendentes têm o papel de influenciar neurônios motores que serão os responsáveis pela contração dos músculos esqueléticos (Nicholls *et al.*, 1992).

Reflexos de preensão palmar, colocação pelas vibrissas, recuperação de decúbito e queda livre são mediados por neurônios da medula espinhal (Jacobson, 1970; Cassydi *et al.*, 1994). Alguns reflexos estão relacionados à sobrevivência, como é o caso da aversão ao precipício (Fox, 1965). Inicialmente as respostas são fracas, mas ao longo dos dias com o desenvolvimento músculo-esquelético tornam-se mais fortes e mais perceptivos (Fox, 1965). Para o reflexo de resposta ao susto primeiro deve ocorrer o desenvolvimento da audição (Fox, 1965). Já para o reflexo de preensão palmar que é inato e desaparecerá à medida que o sistema nervoso central for amadurecido (Jacobson, 1970; Adlard e Dobbing, 1971). Assim, alteração no tempo de aparecimento ou de desaparecimento de algum reflexo pode estar associada ao padrão locomotor (Motz *et al.*, 2005). O reflexo de geotaxia negativa tem como referência uma resposta orientadora expressa em oposição às pistas dos vetores gravitacionais, dessa forma, ela é considerada para o diagnóstico da função vestibular e/ou proprioceptiva (Motz *et al.*, 2005).

Silva *et al.* (2005), protocolaram com referências anatômicas as medidas corporais do rato. Esta técnica bastante refinada é utilizada para avaliação do comprimento do corpo de ratos, medindo o eixo ântero-posterior, eixo látero-lateral, eixo longitudinal e comprimento do corpo (Silva *et al.*, 2005). A partir dessa técnica é possível avaliar alterações no comprimento dos ratos. As características somáticas são possíveis de serem analisadas através de abertura ocular, erupção dos incisivos inferiores e superiores, abertura do conduto auditivo e do pavilhão auditivo (Fox, 1965; Smart e Dobbing, 1971).

2.6 EFEITOS DO TREINAMENTO DE RESISTÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR

O Treinamento é caracterizado como um processo repetitivo e sistemático composto de exercícios progressivos que visam o aperfeiçoamento do desempenho (Rochel *et al.*, 2011). O treino aeróbico tem como finalidade diminuir o percentual de gordura corporal, por ter maior facilidade de priorizar a utilização dos ácidos graxos como principal fonte energética (Guedes *et al.*, 1998). Ele ajuda na melhora da capacidade cardiovascular e trabalha na prevenção da arteriosclerose e hipertensão (Bean, 1999). O treinamento anaeróbico também conhecido como resistido, de força e ou exercício contra resistência é um método de treinamento desportivo cujo principal meio são os pesos (barras, sobrecarga, halteres etc.) e a principal capacidade física treinada é a força (Guedes *et al.*, 2003).

O treinamento de força realizado com pesos é o mais popular no crescente número de academias, com inúmeros benefícios para a saúde e estética que atrai pessoas de todas as idades, visto que promove importantes benefícios na melhoria da aptidão musculo-esquelética, por exemplo, massa muscular e força muscular (Dias *et al.*, 2006). A flexibilidade é um importante componente da aptidão física (Matsudo, 2003). Como consequência, intervenções que aumentem o desempenho da aptidão são importantes para a saúde (Dias *et al.*, 2006). Mesmo que estudos venham sugerindo que programas de treinamento de força podem aumentar a flexibilidade (Dias *et al.*, 2006).

Exercícios de força e intermitentes (que ligam esforços de alta intensidade com períodos de repouso) também exercem uma influência positiva sobre a

cognição, com melhoras no desenvolvimento de diferentes tarefas cognitivas, como velocidade de processamento, atenção seletiva e memória de curto prazo (Filho *et al.*, 2014). É comprovado que atividade motora dinâmica aumenta a demanda energética em áreas do córtex que são responsáveis pelo controle motor, tais como área pré-motora, motora suplementar e sensório-motora (Ogoh *et al.*, 2009). Os jovens fisicamente ativos apresentam maior ativação no espectro de bandas específicas realizadas através do exame de eletroencefalograma em áreas cerebrais específicas, e acredita-se que haja uma existência de uma maior rede de estruturas neurais em diversas regiões cerebrais, tais como lóbulo frontal, córtex cingulado anterior, lóbulo infra-temporal e córtex parietal, em resposta a atividade física regular (Filho *et al.*, 2014). E cada uma dessas regiões está envolvida na realização de tarefas cognitivas específicas (Hilman *et al.*, 2008). Estudo realizado com roedores (33 roedores sendo, 15 adultos e 18 idosos), demonstrou que após realização de treinamento crônico houve um aumento de aproximadamente 55,6% na quantidade de células neurais em proliferação nos grupos treinados (Van Praag *et al.*, 1999).

Evidências recentes sugerem que exercícios localizados com cargas constituem estímulos osteogênicos mais eficientes do que exercícios sem carga e uniformemente distribuídos (Marcus *et al.*, 1991). O desempenho motor é definido como um conjunto de movimentos lineares e eficientes que dão caracterização a execução de um determinado movimento (Almeida, 1999). A execução desses movimentos é oriunda das informações processadas no sistema nervoso central que são transmitidas pelos neurônios motores indo do encéfalo para a medula espinhal e do cérebro para o tronco encefálico e chegando por fim a musculatura esquelética (Gomes *et al.*, 2015). O controle motor permite a execução do movimento com precisão e eficiência durante as atividades físicas (Leporace *et al.*, 2009). O controle de movimento é transmitido a partir de informações sobre a força de contração e a ativação simultânea e coordenada das fibras motoras, dando confiabilidade à produção de um movimento dinâmico (Leporace *et al.*, 2009). Porém, alterações no neurônio motor superior causa dificuldade para gerar força e sustentação (Gomes *et al.*, 2015).

O treinamento de força é uma importante modalidade de exercícios para os que buscam uma melhor qualidade de vida (Gomes *et al.*, 2015). Este tipo de treinamento traz melhora ao sistema neuromuscular com a prática crônica de

atividade física (Gomes *et al.*, 2015). Em humanos o teste de resistência traz melhoria para as fibras musculares, como resistência à fadiga, resistência anaeróbica, ganho de força muscular (envolvido na coordenação motora) e densidade mineral óssea (Hornberger e Farrar, 2004). Em ratos, o exercício por escalada em escada está associado à hipertrofia muscular, alterações no fenótipo de fibra muscular e adaptações neuromusculares (Hornberger e Farrar, 2004). Atualmente os modelos experimentais com ratos permitem elucidar, de forma objetiva e clara várias dúvidas a respeito do efeito do treinamento físico no organismo (Hornberger e Farrar, 2004; Cândido *et al.*, 2017).

O esquema de treinamento de força de intensidade moderada em adultos deve seguir uma série de 8 a 12 repetições de oito a dez exercícios com no mínimo 2 vezes por semana (American College of Sports Medicine, 1998). Este esquema é suficiente para condicionar os principais grupos musculares (American College of Sports Medicine, 1998). Este aumento da força se dá devido à frequência de disparos das unidades motoras (somação temporal), maior recrutamento de unidades motoras (somação espacial) e maior coordenação intra e intermuscular (Maior e Alves, 2003). Ocorre a uma maior expressão de cadeias pesadas de miosina do tipo II com alta atividade da enzima ATPase (Maior e Alves, 2003).

Nas doenças neurológicas existe uma redução das funções motoras, da força, resistência muscular, aumento de espasticidade, contraturas e dores nesses indivíduos (Paiva *et al.*, 2010). Diante disto é recomendado que os níveis de treinamento de resistência se adequem aos dos parâmetros de saúde em geral que são de até 5 vezes por semana com período mínimo de 30 minutos em intensidade moderada de atividade anaeróbia (Paiva *et al.*, 2010). Quando o indivíduo apresenta distúrbios neurológicos, a prática de atividade física não leva ao desaparecimento da sequela, porém, pode retardar sua progressão, principalmente no que diz respeito à rigidez muscular e lentidão dos movimentos (Hauser & Zesiewicz, 2001). Já se sabe que o treinamento de resistência possui um efeito neuroprotetor sobre o cérebro, auxiliando na proteção de várias doenças neurodegenerativas (Sasco *et al.*, 1992). Segundo seus estudos realizados com ratos, os exercícios poderiam diminuir a vulnerabilidade da dopamina à agentes agressores (Sasco *et al.*, 1992). A plasticidade do cérebro e seu poder regenerador podem ser melhorados com a atividade física (Sasco *et al.*, 1992).

Na grande maioria das vezes, a microcefalia é acompanhada de alterações motoras e cognitivas que mudam de acordo com o grau de acometimento cerebral (Brasil, 2016). Desta forma cada paciente poderá ter comprometimentos diferentes, dependendo da área e da extensão do cérebro que foi atingida pela doença, podendo a criança apresentar atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, déficits auditivos, físicos, intelectuais, cognitivos e ou visuais (Brasil, 2016). Devido ao distúrbio de desenvolvimento ocasionado por lesões ou más-formações do sistema nervoso central, a criança com microcefalia apresenta, geralmente, distúrbio sensório-perceptivo-motor (Brasil, 2016). Em relação à cognição, os danos contribuem de forma significativa nas aquisições motoras e funcionais ligadas à rotina da criança (Brasil, 2016). Essas alterações no controle motor podem acarretar prejuízos ao sistema muscular e esquelético, causando encurtamentos musculares, contraturas e deformidades das articulações, ou mesmo prejudicar o funcionamento do sistema respiratório (Brasil, 2016).

Contudo, há uma escassez de relatos na literatura científica, que evidencie a utilização do modelo experimental de microcefalia sobre o desenvolvimento somático, a maturação dos reflexos e a coordenação motora em ratos bem como o treinamento físico de resistência podem melhorar a atividade locomotora, a coordenação motora, a força e o fenótipo muscular diante da microcefalia experimental. Para assim, inovar com extratégias fisioterápicas nas crianças com esta sequela,

3 HIPÓTESE

No modelo experimental de microcefalia induzida pelo busulfan, há retardo do desenvolvimento somático e neuromotor, o treinamento físico de resistência reverte esses efeitos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL DA 1º PARTE DO ESTUDO

Avaliar a maturação somática, as características físicas e o desenvolvimento sensório-motor em ratos provenientes de mães submetidas ou não, durante a gestação, ao busulfan.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA 1º PARTE DO ESTUDO

Avaliar:

- Desenvolvimento somático;
- Aparecimento de características físicas;
- Ontogênese de reflexos.

4.3 OBJETIVO GERAL DA 2º PARTE DO ESTUDO

Avaliar as eventuais repercussões do treinamento físico de resistência sobre o desenvolvimento neuromotor em ratos provenientes de mães submetidas ou não, durante a gestação, ao busulfan.

4.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS DA 2º PARTE DO ESTUDO

Avaliou em ratos submetidos a modelo experimental de microcefalia os efeitos de um programa de treinamento físico de resistência do 35 aos 61 dias de vida pós-natal, sobre:

- Atividade locomotora nos 8, 14, 17 e 21 e 28, 62 dias de vida;
- Teste de força muscular aos 14, 17 e 62 dias de vida pós-natal;
- Coordenação motora em barras paralelas aos 62 dias de vida;
- Coordenação motora em rotarod aos 65 dias de vida pós-natal;
- Peso encefálico nos 28 dias de vida e pesagem dos músculos sóleo e extensor longo dos dedos do lado direito aos 65 dias de vida pós-natal;
- Análise histológica do córtex motor dos animais nos 28 dias de vida.

5 MÉTODOS

5.1 ANIMAIS DA 1ª PARTE DO ESTUDO: MODELO EXPERIMENTAL DE MICROCEFALIA ASSOCIADO A SÍNDROMES CONGÊNITAS: CRITÉRIOS PARA AVALIAÇÃO DE DANOS NO CRESCIMENTO SOMÁTICO, CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E MATURAÇÃO REFLEXA

Foram utilizadas 15 ninhadas oriundas de 15 ratas virgens albinas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), pesando de 220 – 250 g e com idade de 90-120 dias provenientes do biotério do Centro Acadêmico de Vitória, mantidos a temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luz às 20h) e livre acesso à água e alimentação.

Após a confirmação da gestação através da técnica de esfregaço vaginal, foram formados aleatoriamente dois grupos de gestantes, com base na indução farmacológica de microcefalia: Controle (C, n=7 ninhadas) e Busulfan (B, n=8 ninhadas) (O n por ninhada é seguido para garantir a variabilidade genética dos animais dentro de um mesmo grupo, e também expor a quantidade de animais nestes grupos).

O grupo B recebeu *Busulfan* (sigma, 10 mg/kg/0,5 ml/100g de peso corporal das ratas), diluído em óleo de oliva por via intraperitoneal (i.p.). A concentração de 10 mg/kg foi previamente relatada como sendo efetiva para induzir microcefalia por um estudo de dose resposta (Furukawa *et al.* 2007). O grupo Controle recebeu apenas óleo de oliva (0,5 ml/100 g de peso corporal das ratas, i.p.). As ratas foram submetidas à manipulação farmacológica nos dias 12, 13 e 14 de gestação, fase inicial de desenvolvimento do córtex cerebral (Furukawa *et al.* 2007; Desesso, 2005).

Após o nascimento não houve redução das ninhadas para o padrão de 8 filhotes por mãe, pois o critério utilizado para a redução da ninhada (peso corporal entre 6 e 8g) poderia excluir os animais com danos no desenvolvimento (Bento-Santos *et al.* 2011). As ninhadas foram mantidas com suas respectivas mães até 21 dias de vida pós-natais

5.2 ONTOGÊNESE DE REFLEXOS

Foi avaliada diariamente nos dois grupos experimentais a ontogênese de reflexos do 1 ao 21 dia de vida dos animais às 8:00 horas seguindo o método de Fox (1965) e Smart e Dobbing (1971 a).

Para cada reflexo foi considerado o dia do acontecimento depois de três dias consecutivos do aparecimento completo da resposta reflexa esperada.

Preensão Palmar (PP): Este reflexo é primitivo e inato do animal. Para detecta-lo, um bastonete de 5 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro foi pressionado levemente na pata anterior esquerda do animal, a resposta foi considerada negativa após duas tentativas em que o animal deixou de fazer a flexão.

Figura 1 – Teste de preensão palmar realizado durante a lactação.



Fonte: (Barros,1999)

Recuperação de decúbito (RD): O animal foi colocado em decúbito dorsal e teve 10 segundos (s) para virar em decúbito ventral apoiado sobre as 4 patas, sendo considerada positiva (p) a resposta.

Figura 2 – Teste de recuperação de decúbito realizado durante a lactação.



Fonte: (Barros, 1999).

Colocação pelas vibrissas (CV): O rato foi suspenso pela cauda de modo as suas vibrissas tocar a borda da mesa. O animal teve 10 s para colocar as patas dianteiras sobre a mesa tentando caminhar.

Figura 3 – Teste de colocação pelas vibrissas realizadas durante a lactação.



(Campos, 2015).

Aversão ao precipício (AP): O animal foi colocado com as patas dianteiras sobre uma superfície plana e alta (mesa) de forma a detectar o precipício. O animal teve 10 s para se afastar 45° da borda da mesa caracterizando aversão ao precipício.

Figura 4 – Teste de aversão ao precipício realizado durante a lactação.



Fonte: (Barros, 1999).

Resposta ao susto (RS): O animal foi submetido a um estampido agudo realizado com bastonete metálico e um recipiente também metálico (4,5 cm de largura e 6 cm de comprimento) e oco, em uma distância de aproximadamente 10 cm de distância do animal. A resposta foi considerada positiva quando ocorria uma simultânea e rápida retração com imobilização do animal caracterizando susto.

Figura 5 - Teste de resposta ao susto realizado durante a lactação.



Fonte: (Barros, 1999).

Geotaxia Negativa (GN): O animal foi colocado com a cabeça para baixo e o corpo voltado para cima sobre uma rampa de 45° coberta com papel crepom preto. A resposta foi considerada positiva quando o animal girava o corpo em aproximadamente 140° ficando com a cabeça no sentido ascendente no tempo de até 10 s.

Figura 6 - Teste de geotaxia negativa realizado durante a lactação.



Fonte: (Barros, 1999).

Queda livre (QL): O rato foi segurado pelas quatro patas no sentido ventral e solto com o dorso para baixo em uma altura de 30 cm (uma régua perpendicular ao plano serviu para medição), sobre um recipiente (30 cm largura x 12 de comprimento) com algodão para amortecer a queda. Foi considerada a queda livre positiva quando o animal caiu com o ventre para baixo e apoiado sobre as quatro patas.

Figura 7 - Teste de queda livre realizado durante a lactação.



Fonte: (Barros, 1999).

5.3 MEDIDAS MURINOMÉTRICAS

Cada animal foi medido no 1 pós-natal às 8:00 horas, com o auxílio de um paquímetro digital (JOMARCA ®) quanto às seguintes medidas (Silva *et al.*, 2006):

Eixo látero-lateral do crânio: Tendo como referência uma linha imaginária perpendicular ao eixo látero-lateral do crânio, dividindo os pavilhões auriculares ao meio, o animal foi contido com uma das mãos tendo a cabeça deste entre o

indicador e o polegar, e por fim foi realizada a medida do eixo, obtendo valores em mililitro (mm).

Figura 8 - Medidas murinométricas do eixo látero-lateral do crânio durante o período de lactação.



Fonte: (Barros, 1999).

Eixo ântero-posterior do crânio: Foi considerada como referência umas linhas médias que vai do focinho até o ponto de interseção com outra linha perpendicular imaginária. A última passa tangencialmente às extremidades posteriores dos pavilhões auriculares. O animal foi contido com uma das mãos do pesquisador e com a cabeça entre os dedos polegar e indicador, obtendo valores em mm.

Figura 9 - Medidas murinométricas do eixo ântero-posterior do crânio durante o período de lactação.



Fonte: (Barros, 1999).

Eixo longitudinal: O animal teve o dorso anterior e os posteriores comprimidos e a cauda de encontro a uma superfície plana e lisa (mesa). E então foi feito marcações com caneta que foram de encontro com o focinho e a base da cauda do rato, medindo assim a distância que coincide em mm.

Figura 10 - Medidas murinométricas do eixo longitudinal do crânio durante o período de lactação.



Fonte: (Barros, 1999).

Comprimento da cauda: O rato foi segurado por uma das mãos do pesquisador e foi colocada sua cauda verticalmente sobre uma base plana e lisa (mesa), foi realizada a marcação com caneta da base da cauda e da sua extremidade, obtendo valores em mm.

Figura 11 - Medidas murinométricas do comprimento da cauda durante o período de lactação



Fonte: (Barros, 1999).

5.4 CARACTERÍSTICAS SOMÁTICAS

As características foram avaliadas diariamente às 8:00 horas durante a lactação usando o método de Smart e Dobbing (1971). A idade de maturação foi definida com o dia que foi observado pela primeira vez, que são:

Abertura do pavilhão auditivo: Os dois pavilhões ficam dobrados por serem caracteres primitivos, e com o tempo se desdobram ficando palpáveis pelo pesquisador.

Figura 12 -Análise da abertura do pavilhão auditivo.



Fonte: (Barros, 1999).

Abertura do conduto auditivo: Os dois orifícios primitivamente nascem fechados e com o passar do tempo abre-se, fica visível de ver com o auxílio de uma lupa com foco luminoso.

Figura 13 - Análise da abertura do conduto auditivo.



Fonte: (Barros, 1999).

Abertura ocular: Ambos os olhos abertos e com movimento palpebral.

Figura 14 - Análise da abertura ocular.



Fonte: (Barros, 1999).

Erupção dos incisivos inferiores: Considerou-se o rompimento da gengiva com exposição incisal dos dentes inferiores.

Figura 15 - Análise da erupção dos incisivos inferiores.



Fonte: (Barros, 1999).

Erupção dos incisivos superiores: Considerou-se o rompimento da gengiva com exposição incisal dos dentes superiores.

Figura 16 - Análise da erupção dos incisivos inferiores e superiores.



Fonte: (Barros, 1999).

5.5 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (número do protocolo CEUA 0040/2016) (Anexo A). O protocolo de manipulação e bem-estar dos animais segue as orientações da Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica (DBCA), lançada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA DO ARTIGO

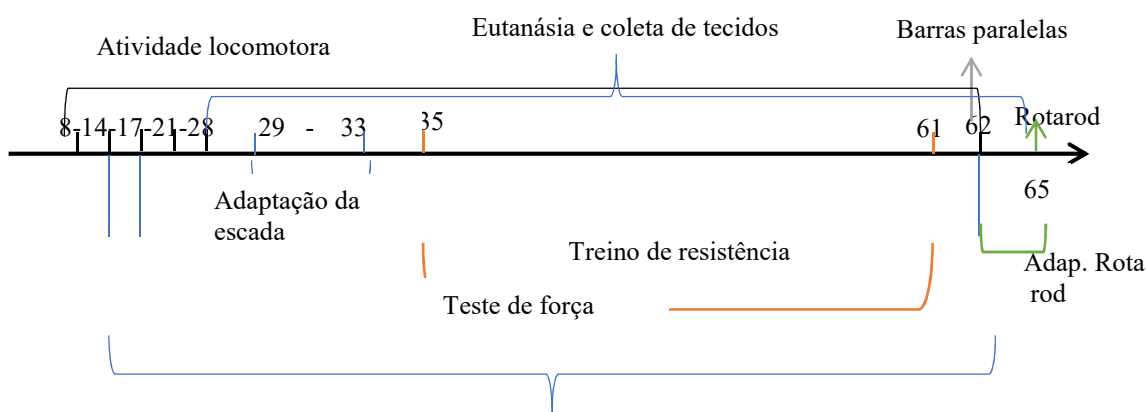
- A análise dos dados foi realizada por meio do programa estatístico GraphPad Prism 7;
- **Teste de Kolmogorov-Smirnov seguido de teste t de Student –** Crescimento somático;
- **Um teste de Mann Whitney –** Características somáticas e ontogênese de reflexos;
- **Dados expressos em desvio padrão;**
- **Significância estatística foi definida como $P < 0,05$ em todos os casos.**

5.7 ANIMAIS DA 2º PARTE DO ESTUDO: EFEITOS DO TREINAMENTO DE RESISTÊNCIA EM ANIMAIS SUBMETIDOS À MODELO EXPERIMENTAL DE MICROCEFALIA.

Projeto foi realizado no Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB), no Centro de Ciências da Saúde UFPE – Recife. Foram utilizadas 12 ratas albinas da linhagem Wistar. Para a obtenção dos filhotes foram colocados macho e fêmea na gaiola, na proporção de 1:2 para o acasalamento. A confirmação da gestação foi realizada através da técnica de esfregaço vaginal e confirmada com a presença de espermatozóide e seguida de acompanhamento feito através do aumento do peso corporal da rata, que foi analisado a cada semana. A partir daí, foram formados aleatoriamente dois grupos de gestantes, com base na indução farmacológica de microcefalia: Controle (C, n=7) e Busulfan (B, n=6). A indução de microcefalia se deu por intermédio da administração de Busulfan (sigma, 10 mg/ kg de peso corporal), suspenso em óleo de oliva (0,5 ml / 100 g de peso corporal das ratas) , nos dias 12, 13 e 14 de gestação (Furukawa *et al.* 2007), enquanto o grupo controle recebeu o veículo, óleo de oliva (0,5 ml / 100 g de peso corporal das ratas), ambos administrados por via intraperitoneal (i.p.). O período de administração do Busulfan corresponde à fase inicial de desenvolvimento do córtex cerebral (Desesso, 2005). Após o nascimento, não houve redução das ninhadas e os filhotes foram mantidos com suas respectivas mães, até os 21 dias de vida pós-natal (P22). No 21º dia de vida, foi realizado o desmame e separados um número de 3 a 4 ratos machos por gaiola. A partir daí, foram alimentados apenas com dieta padrão de biotério (Presence – ratos e camundongos).

Ratos machos pertencentes a ambos os grupos passaram por um período, dos 35 aos 61 dias de vida, de treinamento de resistência em escada (Antonio-Santos *et al.* (2016). Assim, dos grupos iniciais Controle e Busulfan, foram compostos os seguintes grupos; Controle não-treinado (CNT, n=5), Controle treinado (CT, n=6), Busulfan não treinado (BNT, n=5) e Busulfan treinado (BT, n=5). Experimentos que avaliaram a condição motora dos animais foram realizados antes e após o período de treinamento de resistência. A atividade locomotora em campo aberto, foi analisada aos 8, 14, 17, 21, 28 e 62 dias de vida. A avaliação da força muscular foi avaliada aos 14, 17, 62 dias de vida. Os experimentos que avaliam coordenação motora foram realizados após o período de treinamento de resistência.

A coordenação em barras foi realizado aos 62 dias de vida, e a coordenação no Rotarod, aos 65 dias de vida. Por fim, aos 65 dias de idades, os animais foram eutanasiados para extração do encéfalo, músculos extensor longo dos dedos direito e esquerdo, músculos sóleo direito e esquerdo para passagem.

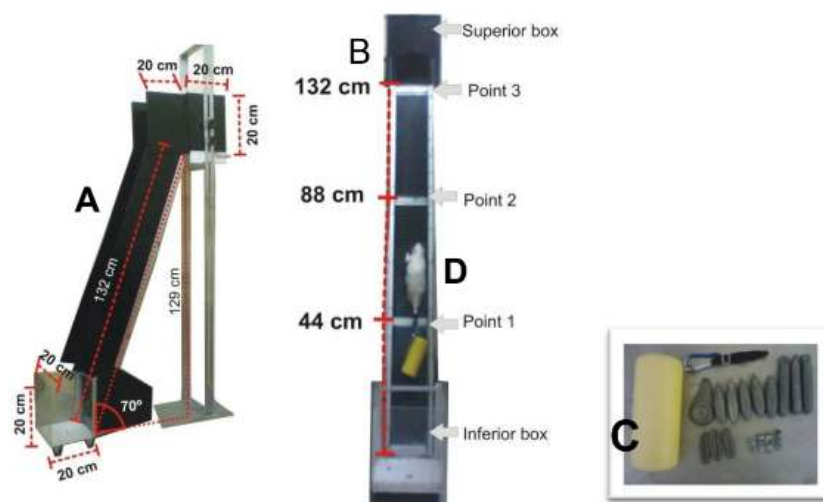


5.8 PROGRAMA DE TREINAMENTO FÍSICO DE RESISTÊNCIA

O modelo e escada utilizada para o treinamento dos ratos foi adaptado de Antonio-Santos *et al.* (2016). Do 29 aos 33 dias de vida pós-natal, os animais passaram por adaptação da escada. No 1º dia de adaptação foram colocados por 30 segundos dentro da caixa inferior transparente, logo após foram colocados no ponto 1, 2 e 3 e subiram consecutivamente por no máximo 30 segundos e logo após, foram colocados no ponto 1 por 6 vezes consecutivas e realizaram a subida na escada. Nos 2º e 3º dias de adaptação, foram colocados a partir do ponto 1 e fizeram 10 subidas consecutivas. No 4º dia, subiram com o mosquetão preso com esparadrapo ao rabo, no 5º dia subiram com o mosquetão e tubete vazio presos com esparadrapo no rabo. Os 34 dias de vida pós-natal foi de descanso. A partir do 35 dias de vida, começou o teste, no primeiro dia os animais realizavam o teste de carregamento máximo com 75% do peso corporal e as cargas eram chumbo de pesca, a partir da segunda subida era acrescida 10 gramas, após 3 erros consecutivos (o animal não conseguia realizar o teste no tempo previsto de 60 segundos ou se soltasse a escada), era considerada a carga máxima a última subida realizada com sucesso. Entre as subidas existia o tempo de descanso de 120 segundos. No dia posterior ao teste de sobrecarga máxima, era realizado o treinamento de resistência por 5 dias consecutivos e o 6º dia era o descanso. A carga máxima era dividida em 30% (1ª subida), 50% (2ª subida) e 80% (3ª subida até a décima ou até cometer os erros ditos anteriormente). O animal tinha o tempo

máximo para subir de 40 segundos e 90 segundos de descanso entre as repetições. O treinamento durou 4 semanas.

Figura 17 - (A) Vista lateral do aparato de treinamento (uma escada com altura: 129 centímetros; largura: 20cm; comprimento: 132 centímetros; com 87 degraus e 1 cm entre os degraus) (B) Vista frontal do aparato de treinamento, pontos para colocar os ratos (caixa inferior transparente, ponto 1 a 44 centímetros da base, ponto 2 a 88 cm da base, ponto 3, para 132 centímetros a partir da base e caixa superior escura). (C) O tubete consistia em um recipiente onde as cargas foram colocadas e uma fita de fixação formada de fita semi-elástica com um gancho na extremidade. A fita de fixação foi cuidadosamente fixada na porção proximal da cauda com um esparadrapo. As cargas foram confeccionadas com chumbo de pesca e possuíam pesos diferentes (D) Rato subindo a escada com uma sobrecarga fixa em sua cauda. Adaptado de Antonio-Santos *et al.* (2016).



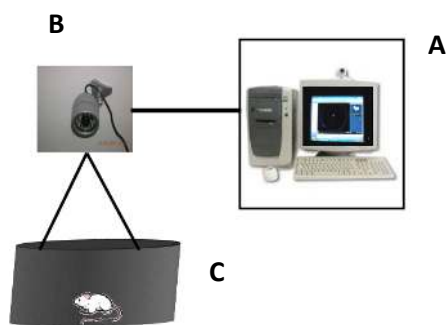
Fonte: (Antonio-Santos *et al.*, 2016).

5.9 ATIVIDADE LOCOMOTORA

Os filhotes machos foram avaliados nos 8, 14, 17 e 21 e 28, 62 dias de vida pós-natal. Um sistema de monitoramento em campo aberto circular ($\varnothing 1\text{m}$) foi usado, delimitado por paredes de 30 cm de altura, com superfícies internas de cor preta e em sua base uma superfície de EVA (etil vinil acetato) também preta, de forma que seja obtido um contraste entre o animal e o campo usado. Uma câmera digital (VTR® 6638-CCTV System), com um sensor de infravermelho e LED de iluminação, fixada no teto a uma distância de 2,65m do solo e posicionada verticalmente ao centro do campo para filmar o animal enquanto este se movimentar. A câmera

apresenta resolução de 420 linhas, velocidade de 1/60 e 1/100 s e sua sensibilidade permite registrar imagens com iluminação mínima de até 0,1 lux. Para as filmagens foi utilizado o software Ulead VideoStudio®(ARAGÃO *et al.*, 2011). Os ratos foram posicionados no centro do campo aberto e filmados por um período de 5 minutos cada um. Parâmetros analisados: massa corporal (g), distância total (m), distância real (m), deslocamento rotacional (m), velocidade média (m/s), gasto médio de energia (J), gasto energético total (J), potência média (mW), tempo parado (s), número de paradas, tempo parado/número de paradas (s), tempo nas áreas (s).

Figura 18: A - Representação esquemática do Campo Aberto e do sistema de monitoramento; B – Câmera digital utilizada no registro das filmagens; C - 8: Imagem do rato no campo. Adaptado de Aragão *et al.*, (2006).



Fonte – (Aragão *et al.*, 2006).

5.10 ESTUDO DA FORÇA MUSCULAR

Os animais foram suspensos pela base da cauda enquanto segurava em um cabo de aço (com 3 milímetros de diâmetro), distante 1 metro do chão, tendo que ficar agarrado pelos membros anteriores por um tempo limite de 60 segundos. O teste foi realizado com uma tentativa por dia nas idades de 14, 17 e 62 dias de vida pós-natal. Método adaptado de McDonnell-Dowling *et al.*, (2015).

Figura 19 - Animal com microcefalia aos 65 dias de vida



Foto da autora.

5.11 ESTUDO DA COORDENAÇÃO MOTORA NAS BARRAS PARALELAS

O aparato consiste de 2 barras paralelas de 1.0 cm de diâmetro, com comprimento de 1,15 m com uma distância entre elas de 2,5 cm, conectadas a uma plataforma de 15x50 cm². O teste foi realizado no dia 62 de vida pós-natal (Ding *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2002a). Foram realizadas filmagens de duração de 5 minutos e posterior análise. Realizava-se sonorização levemente com aparelho metálico e com a utilização de rações colocadas nas extremidades do aparelho com o intuito de fazer o animal caminhar de um lado para o outro. Logo após foi contabilizado o tempo de imobilização, tempo de movimento (caminhando e virando de posição na haste) e quantidade de vezes que o animal deixava a pata traseira cair da haste (erros cometidos). Aparato desenvolvido durante minha pesquisa. O teste foi adaptado de Ding *et al.* (2002a, 2004).

Figura 20: Representação do aparelho de barras paralelas com o animal realizando o teste.



Foto da autora.

5.12 ESTUDO DE COORDENAÇÃO MOTORA DE ROTAROD

Os animais foram colocados em uma haste texturizada de 60 mm de diâmetro e 75 mm de comprimento, em rotação. A adaptação foi realizada por 3 dias consecutivos com rotação de 10 rpm e duração de 2 minutos. No 4º dia, previamente ao teste ocorreu mais uma adaptação de 2 minutos com velocidade de 16 rpm. Logo após a última adaptação, foi realizado o teste e então contabilizado o tempo. A rotação do teste foi de 25 rpm e o tempo máximo sobre a haste era de 7 minutos, ocorrendo 5 repetições, entre cada repetição existia o descanso de 15 minutos. Adaptado no estudo de Marques *et al.*, (2014).

5.13 PESAGEM E COLETA DE TECIDOS

Aos 65 dias de vida pós-natal, os animais foram pesados e, em seguida, eutanasiados por decaptação para extração dos músculos extensor longo dos dedos direito e músculos sóleo direito e. Estes tecidos foram lavados em solução de NaCl a 0,9% e pesados em balança eletrônica (Marte®, modelo AL 500, com sensibilidade de 0,001g – MG, Brasil).

5.14 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO CÓRTEX CEREBRAL

No 28º dias de idade, os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina (50 mg/kg, ip) e submetidos a perfusão transcardíaca imediata com solução salina tamponada fosfatada seguida de solução fixadora (4% de paraformaldeído em PBS 0,1 M, pH 7,4 a 4° C). Após a perfusão, os encéfalos foram extraídos da caixa craniana e logo após foram fixados na mesma solução fixadora a 4°C durante uma noite. Logo após foram desidratados em solução crioprotetora (30 % de sacarose em PBS 0.1 M) também a 4°C durante todo o tempo necessário. Logo em seguida, foram armazenados em freezer -80 °C (graus Celsius). Foram realizados cortes seriados do cérebro de cada animal (20 µm de espessura) em direção à região occipital. Os cortes foram submetidos à coloração pela cresil-violeta e foram visualizados ao microscópio óptico. Realizaram-se estudos morfométricos por microscopia óptica no córtex motor (M1) que está ligado à área dos membros inferiores, identificado através de coordenadas estereotáticas (3.72 a 0.00 mm de bregma) (Paxinos; Watson, 1986). As imagens da área especificada foram fotografadas com aumento de 40x (para contagem de células na camada V), usando uma câmera digital adaptada a um microscópio óptico (OLYMPUS modelo U-CMAD-2) e a um sistema digital de análise de imagens. Foi contada a unidade de área (1365.84 µm²) de cada rato manualmente em 10 campos em cada corte (cinco no hemisfério esquerdo e cinco no direito) (Marcuzzo *et al.*, 2010). A identificação dos neurônios foi feita pela presença de um citoplasma corado e pelo seu tamanho (rotineiramente é maior que as células da glia e com formato não esférico) (Marcuzzo *et al.*, 2010). As células da glia geralmente são menores do que os neurônios e possuem aspecto esférico (Marcuzzo *et al.*, 2010). A contagem foi realizada pelos neurônios piramidais característicos (com os nucléolos claramente visíveis).

5.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

- A análise dos dados foi realizada por meio do programa estatístico GraphPad Prism 7
- **Teste paramétrico anova seguido do pós-teste de Bonferroni** – atividade locomotora, barras paralelas, rotarod, peso encefálico e peso muscular aos 65 dias;
- **Teste de Mann-Whitney** – teste de força nos 14 e 17 dias;
- **Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunns** – Teste de força aos 62 dias;
- **Teste estatístico paramétrico anova two way, seguido do pós-teste de Tukey** – treinamento de resistência;
- **Teste de paramétrico Kolmogorov-Smirnov seguido de teste t student** – peso encefálico e análise encefálica nos 28 dias de vida pós-natal;
- **Dados apresentados em erro padrão;**
- **Significância estatística foi definida como $P < 0,05$ em todos os casos.**

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO DA 1ª PARTE DO ESTUDO ESTÁ DISPOSTO NO APÊNDICE A - EXPERIMENTAL MODEL OF MICROCEPHALY ASSOCIATED WITH CONGENITAL SYNDROMES: CRITERIA FOR EVALUATION OF DAMAGE IN SOMATIC GROWTH, PHYSICAL FEATURES AND REFLEX MATURATION.

O MESMO FOI SUBMETIDO À REVISTA NEUROTOXICOLOGY AND TERATOLOGY (ANEXO B).

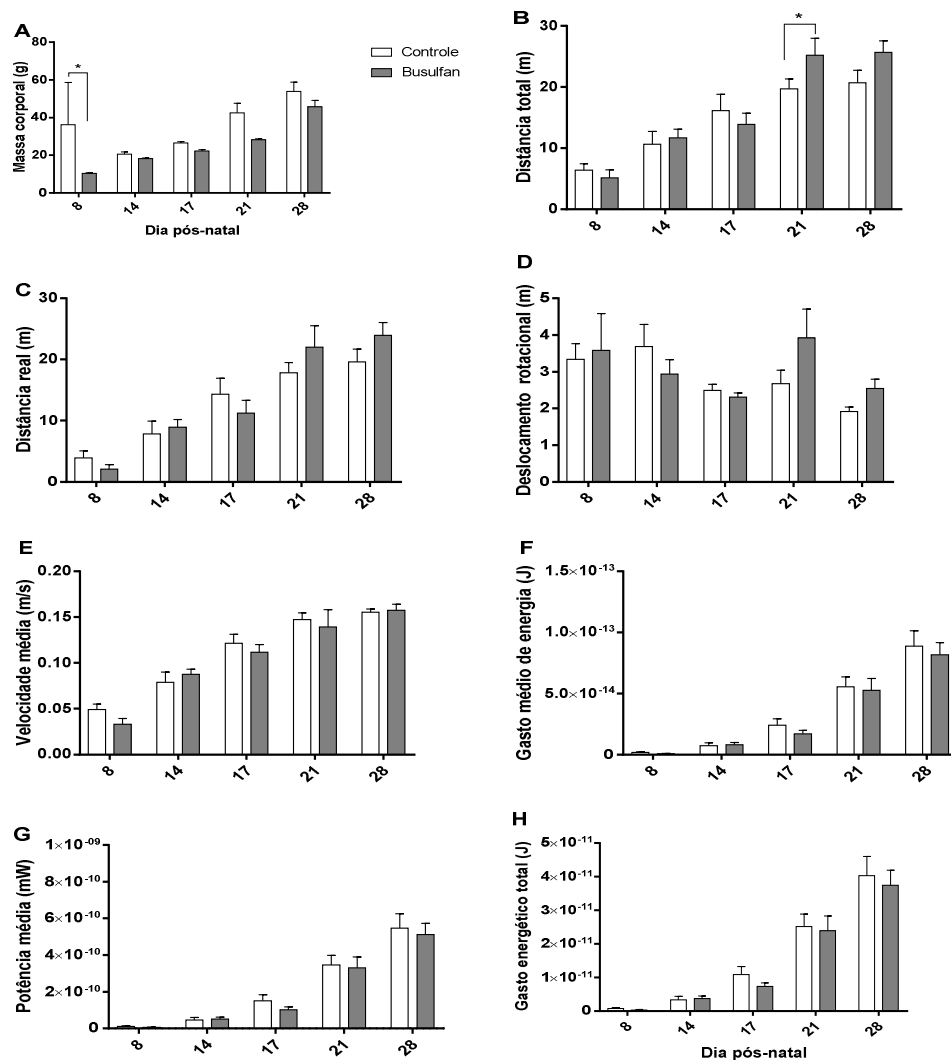
6.2 RESULTADOS DA 2ª PARTE DO ESTUDO - EFEITOS DO TREINAMENTO DE RESISTÊNCIA EM ANIMAIS SUBMETIDOS A MODELO EXPERIMENTAL DE MICROCEFALIA.

6.3 ATIVIDADE LOCOMOTORA

O teste de atividade locomotora foi feito aos 8, 14, 17, 21, 28 e 62 dias de vida. No oitavo dia de vida, foi observado menor massa corporal (gramas) do grupo busulfan em comparação com o grupo controle (8 dias – Controle: $13,80 \pm 0,372$ vs Busulfan: $9,70 \pm 2,828$, $p < 0,022$) (figura 1A); Foi observado menor tempo parado/número de paradas (segundos) (8 dias – Controle: $3,249 \pm 3,979$ vs Busulfan: $6,09 \pm 0,524$, $p < 0,001$) (Figura 1K) e maior tempo na área intermediária (segundos) (8 dias – Controle: $427,3 \pm 12$ vs Busulfan: $147,5 \pm 41,94$, $p < 0,036$) (Figura 1L). No vigésimo primeiro dia de vida, observou-se maior distância total percorrida (metros) no campo aberto do grupo busulfan em relação ao controle (21 dias - Controle: $19,68 \pm 147$ vs Busulfan: $1456,7 \pm 41,4$ $p < 0,047$) (figura 1B). Não foi visto diferença estatística na distância real (Figura 1C), deslocamento rotacional (Figura 1D), velocidade média (Figura 1E), gasto médio de energia (Figura 1F), gasto energético total (Figura 1G), potência média (Figura 1H), tempo parado (Figura 1I), número de paradas (Figura 1J), tempo nas áreas aos 14 dias (Figura 1M), tempo nas áreas aos 17 dias (Figura 1N), tempo nas áreas aos 21 dias (Figura 1O), tempo nas áreas aos 28 dias (Figura 1P).

Aos 62 dias de idade, observamos a influência do treinamento sobre os parâmetros da atividade locomotora. O grupo controle não treinado (CNT)

apresentou maior deslocamento rotacional (metros) em comparação ao grupo busulfan não treinado (BNT) (CNT: $3,790 \pm 1,695$ vs BNT: $2,525 \pm 0,171$, $p < 0,0231$) (Figura 2D), e o Controle treinado (CT) em relação ao Busulfan treinado (BT) (CT: $3,972 \pm 0,055$ vs BT: $2,765 \pm 0,362$, $p < 0,0256$) (Figura 2D) mostrando que o animal apresenta dificuldade de locomoção, e que o treino foi benéfico para o busulfan treinado, assim como também foi visto no tempo parado (segundos) na área central do campo aberto, o animal busulfan não treinado (BTN) ficou mais tempo parado que o busulfan treinado (BT) (BNT: $112,3 \pm 94,3$ vs BT $387,7 \pm 75,00$, $p < 0,0206$) (Figura 2L). Mas não foi visto diferença na massa corporal (Figura 2A), distância total (Figura 2B), distância real (Figura 2C), deslocamento rotacional (Figura 2D), velocidade média (Figura 2E), gasto médio de energia (Figura 2F), potência média (Figura 2G), tempo parado (Figura 2H), número de paradas (Figura 2I), número de paradas (Figura 2J), tempo parado/número de paradas (Figura 2K).



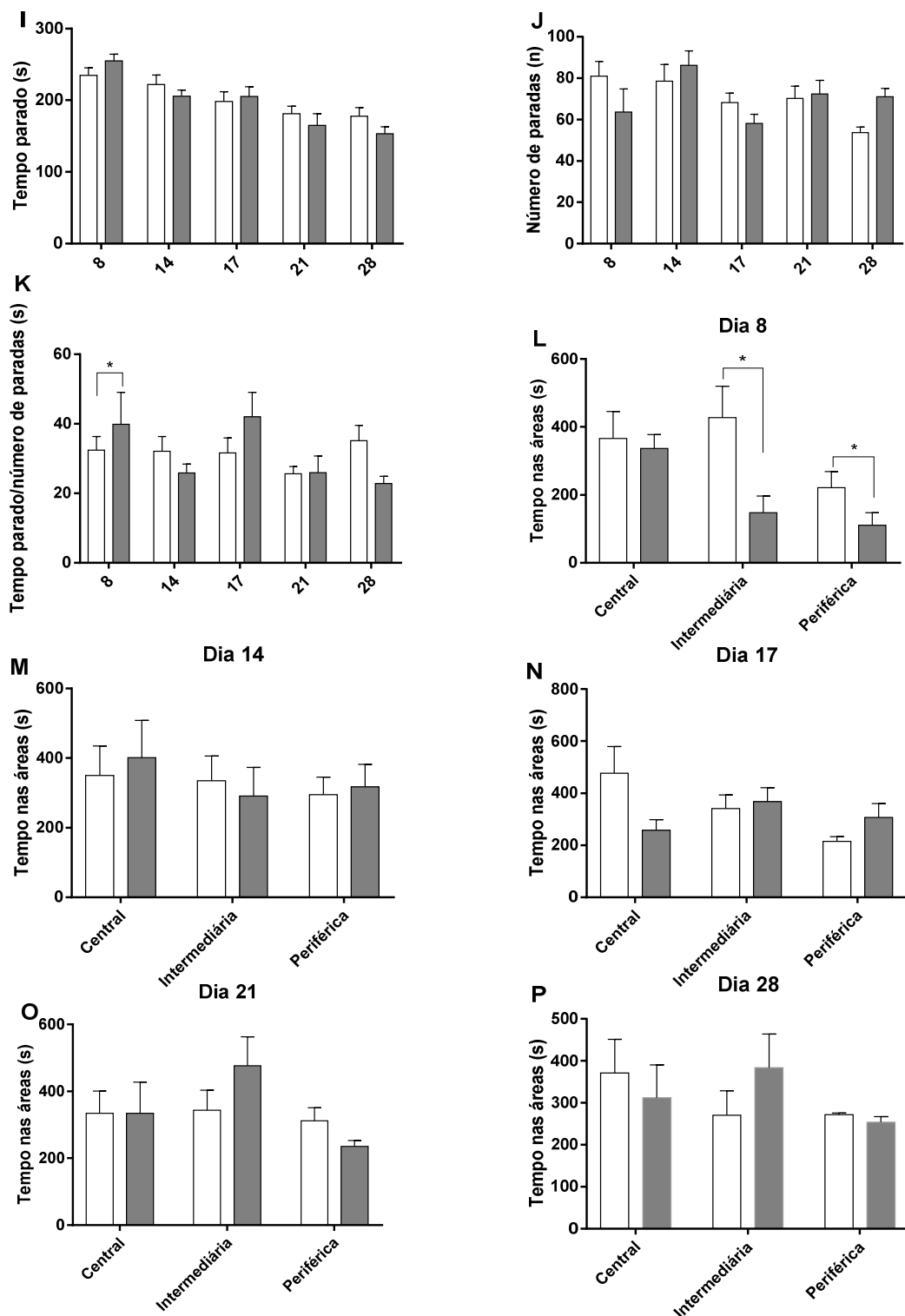
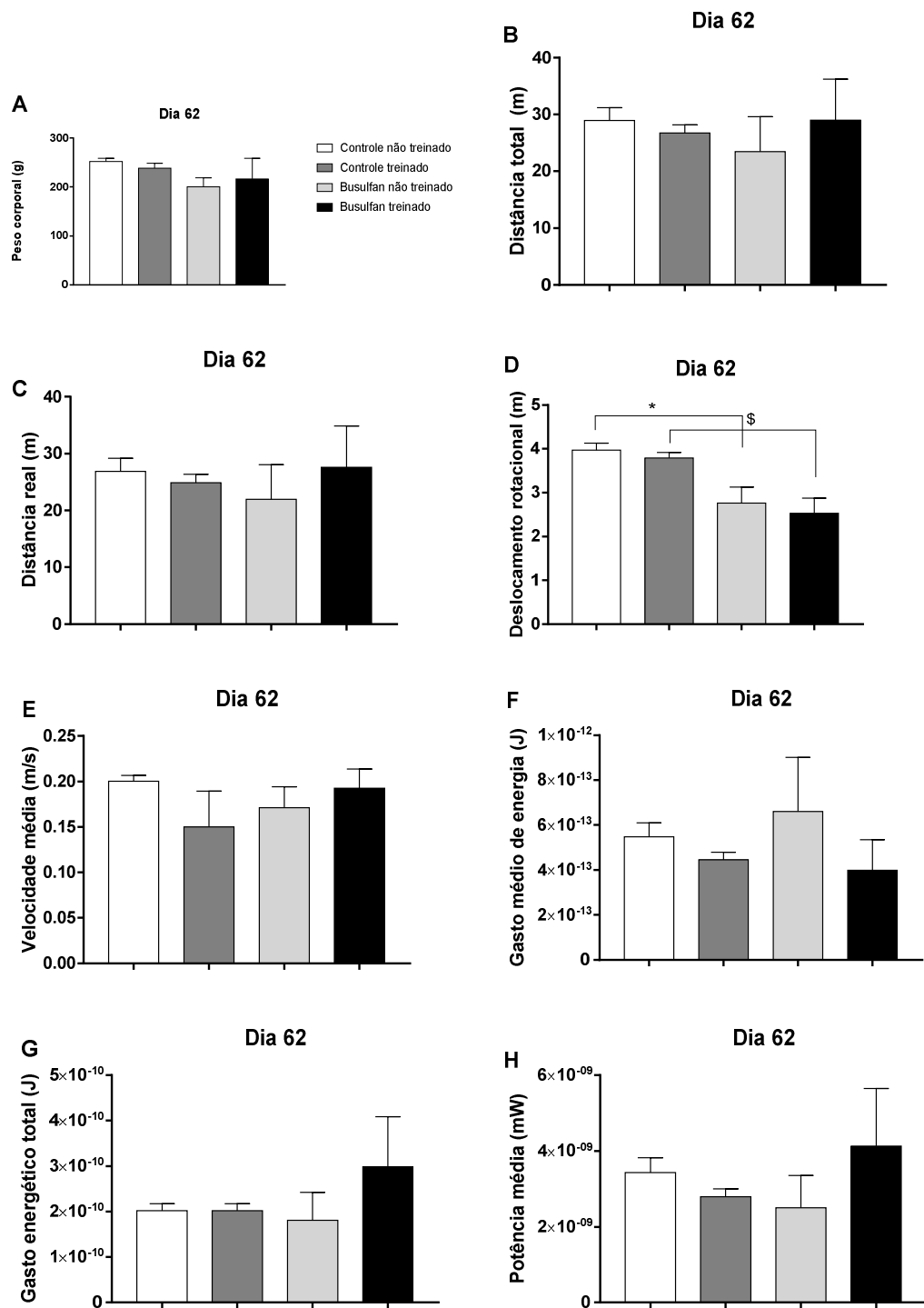


Figura 1: Atividade locomotora em ratos controle e busulfan aos 8,14,17,21,28 dia de vida pós-natal. (A) Massa corporal (g); (B) Distância total (m); (C) Distância real (m); (D) Deslocamento rotacional (m); (E) Velocidade média (m/s); (F) Gasto médio de energia (J); (G) Gasto energético total (J); (H) Potência média (mW); (I) Tempo parado (s); (J) Número de paradas (n); (K) Tempo de parada/número de paradas (s); (L) Tempo 8 dias (s); (M)Tempo 14 dias (s); (N) Tempo 17 dias (s); (O)Tempo 21 dias (s); (P) Tempo 28 dias (s). Controle (n°/ ninhada = 12), Busulfan (n°/ninhada = 11). Valores são expressos em Média $\pm$ erro padrão. ANOVA Two-Way medidas repetidas *p<0,05 seguido de teste Bonferroni.



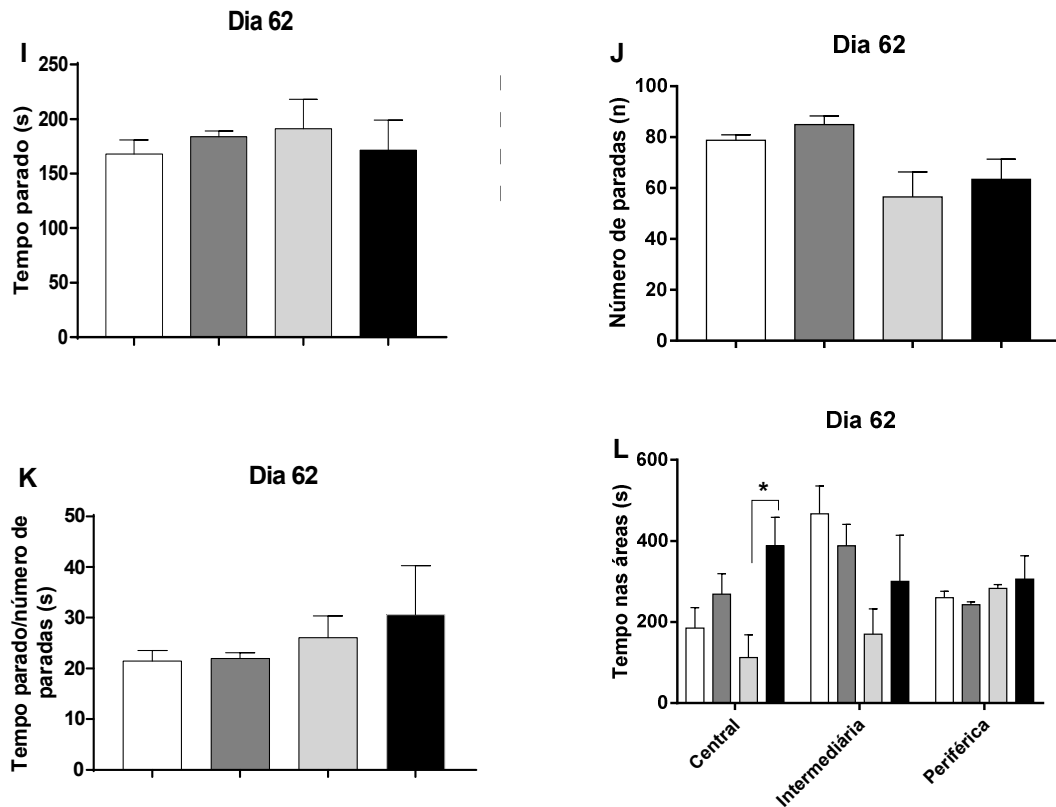


Figura 2: Efeito do treinamento físico sobre o teste de comportamento de ratos controles e busulfan. Aos 62 dias de idade, ratos pertencentes aos grupos Controle não treinado ($n^{\circ}/\text{ninhada}=5$), Controle treinado ($n^{\circ}/\text{ninhada}=6$), Busulfan não treinado ($n^{\circ}/\text{ninhada}=6$) e Busulfan treinado ($n^{\circ}/\text{ninhada}=5$), passaram pelo teste de atividade locomotora, onde foi registrado. (A) Massa corporal (g); (B) Distância total (m); (C) Distância real (m); (D) Deslocamento rotacional (J); (E) Velocidade média (m/s); (F) Gasto médio de energia (J); (G) Gasto energético total (J); (H) Potência média (mW); (I) Tempo parado (s); (J) Número de paradas (n); (K) Tempo de parada/número de paradas (s); (L) Tempo nas áreas (s). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão, *CNT e BNT; \$CT e BT * $P<0,05$ ANOVA two way, seguido de teste Bonferroni.

6.4 FORÇA MUSCULAR

O teste de força foi realizado em idades diferentes, 14, 17 e 62 dias de vida. Os animais tratados não apresentaram diminuição da força aos 14 dias (Figura 3A) e 17 dias (Figura 3B), aos 62 dias (Figura 4^a).

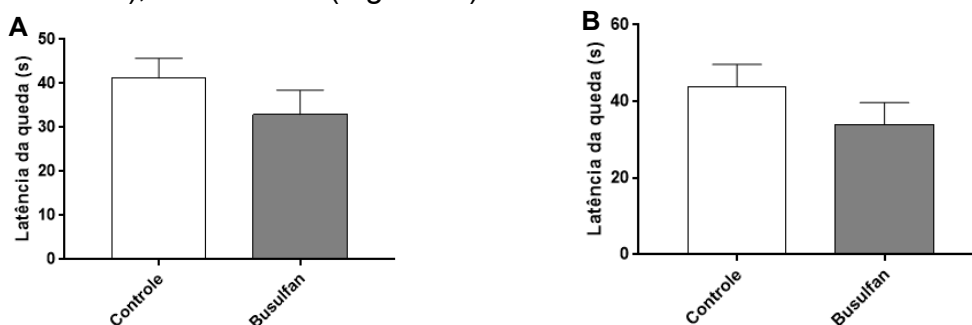


Figura 3: Latência da queda durante o teste de força muscular aos 14 (A) e 17 (B) dias pós-natal. Controle (n° / ninhada = 12), Busulfan (n° / ninhada = 12), passaram pelo teste de força. Valores expressos em média $\pm$ erro padrão, $P < 0,05$ teste de Mann Whitney.

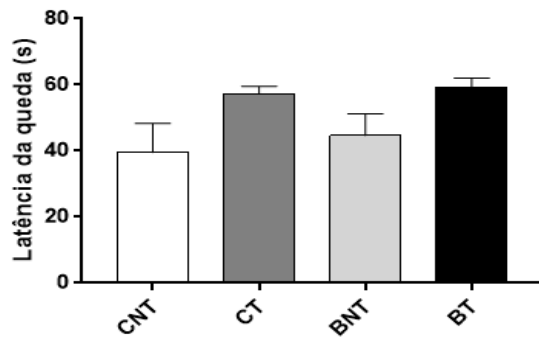


Figura 4: Latência da queda durante o teste de força muscular aos 62 dias pós-natal, ratos pertencentes aos grupos Controle não treinado - CNT (n° / ninhada = 5), Controle treinado - CT (n° / ninhada = 7), Busulfan não treinado - BNT (n° / ninhada = 7) e Busulfan treinado - BT (n° / ninhada = 5). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão, $*P < 0,05$ Kruskal Wallis, seguido de teste seguido de DUNN.

6.5 TREINAMENTO DE RESISTÊNCIA

O treinamento físico realizado durante as quatro semanas não se mostraram eficientes para aumentar o peso das sobrecargas (Figura 5A) e das 10 gramas entre as subidas (Figura 5B).

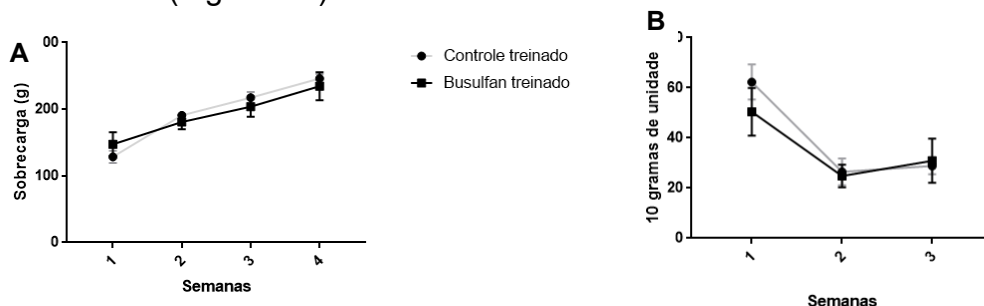


Figura 5: Efeito do treinamento físico em ratos controles e busulfan aos 62 dias pós-natal. Controle treinado (n° / ninhada = 7) Busulfan treinado (n° / ninhada = 6), passaram pelo treinamento de resistência nos animais durante 4 semanas (A) e médias das 10 gramas acrescidas entre as semanas de treino (B). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão, $p < 0,05$ ANOVA two way, seguido de teste Tukey.

6.6 BARRAS PARALELAS E ROTAROD

Os animais realizaram o teste de barras paralelas aos 62 dias de vida, após o treinamento de resistência. E foi encontrado diferença na média de tempo andando, foi menor no grupo CT em relação ao BT (CT: $28,5 \pm 12,59$ m vs BT: $158 \pm 21,2$ m, $p < 0,0032$) (Figura 6B), CNT e CT (CNT: $117 \pm 21,21$ m vs CT: $28,5 \pm EP$ m,

$p < 0,0400$) (Figura 6B), CNT em relação a BNT (CNT: $117 \pm 21,21$ m vs BNT: $180 \pm 18,72$ m, $p < 0,0394$) (Figura 6B). Quando foi analisada a média de erros verificamos que CNT fez menos erros que BNT (CNT: $19 \pm 2,112$ m vs BNT: $34,5 \pm 4,201$ m, $p < 0,0098$) (Figura 6C) e que CT menos que BT (CT: $16 \pm 3,612$ m vs BNT: $34,5 \pm 4,201$ m, $p < 0,0438$) (Figura 6C). Como os animais busulfan apresentam características de se movimentar mais, porém não apresenta uma boa coordenação motora. O rotarot (Figura 6D) não conseguiu mostrar diferença entre os grupos, porém o grupo BNT apresentou uma característica de cair mais que os todos os grupos e que quando treinados a latência da queda foi menor.

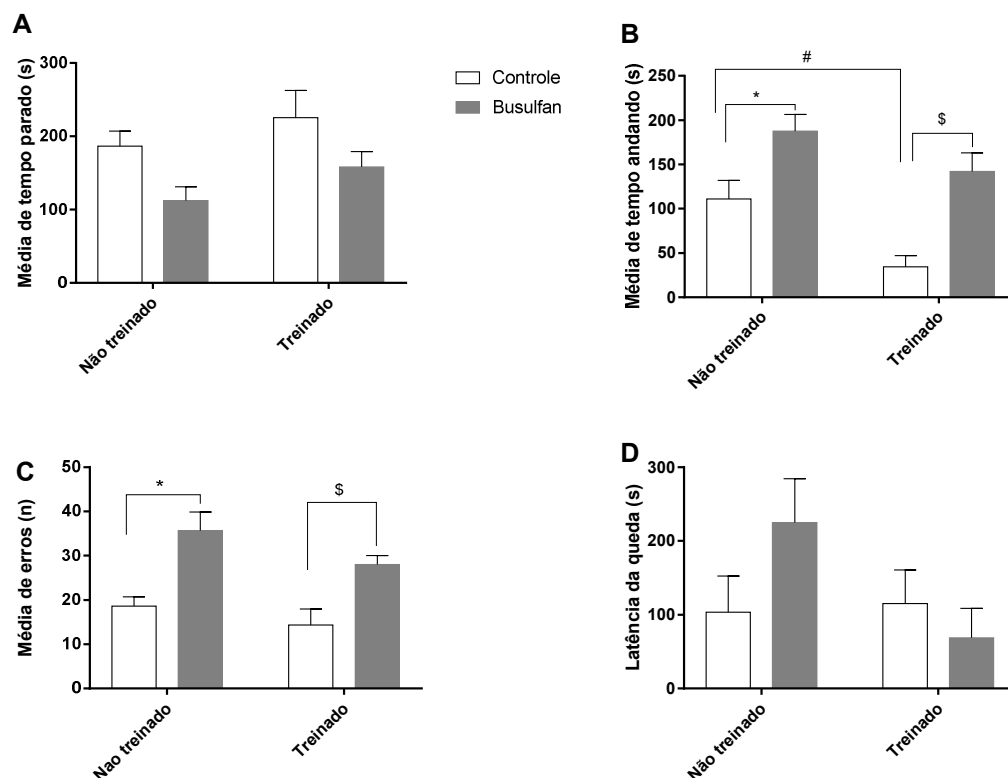


Figura 7: Avaliação em barras paralelas de ratos controles e busulfan aos 62 dias pós-natal. Controle não treinado ($n^\circ/\text{ninhada}=5$), Controle treinado ($n^\circ/\text{ninhada}=7$), Busulfan não treinado ($n^\circ/\text{ninhada}=6$) e Busulfan treinado ($n^\circ/\text{ninhada}=5$), passaram pelo teste de barras paralelas e rotarod, onde foi registrado média de tempo parado (A), média de andando (B), média de erros (C), tempo de latência (D). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão, * $P < 0,05$ *CNT vs BNT, \$CT vs BT, #CNT vs CT ANOVA two way, seguido de teste Bonferroni.

6.7 PESO CORPORAL E MUSCULAR

O peso encefálico absoluto aos 28 dias de vida foi diferente entre os grupos controle e busulfan (C: $1,34 \pm 0,0320$ g vs B: $1,06 \pm 0,0407$ g, $p < 0,0005$) (Figura 8A). O peso corporal dos animais aos 65º dia de vida foi diferente entre os grupos CNT e BNT (CNT: $259 \pm 1,496$ g vs BNT: $251 \pm 1,682$ g, $p < 0,0120$) (Figura 8B), BNT e BT

(BNT: $251 \pm 1,682$ g vs BT: $254 \pm 1,058$ g, $p < 0,0232$) (Figura 8B). Mostrando que o aumento da massa muscular fez aumentar o peso corporal dos animais.

Os músculos depois de dissecados foram pesados e normalizados mostrando diferença no peso absoluto do músculo EDL direito entre os grupos BNT e BT (BNT: $0,077 \pm 0,012$ g vs BT: $0,100 \pm 0,010$ g, $p < 0,05$) (Figura 8G). Porém, não foi visto diferença entre o peso encefálico relativo (Figura 8C), peso muscular relativo do EDL direito (Figura 8D).

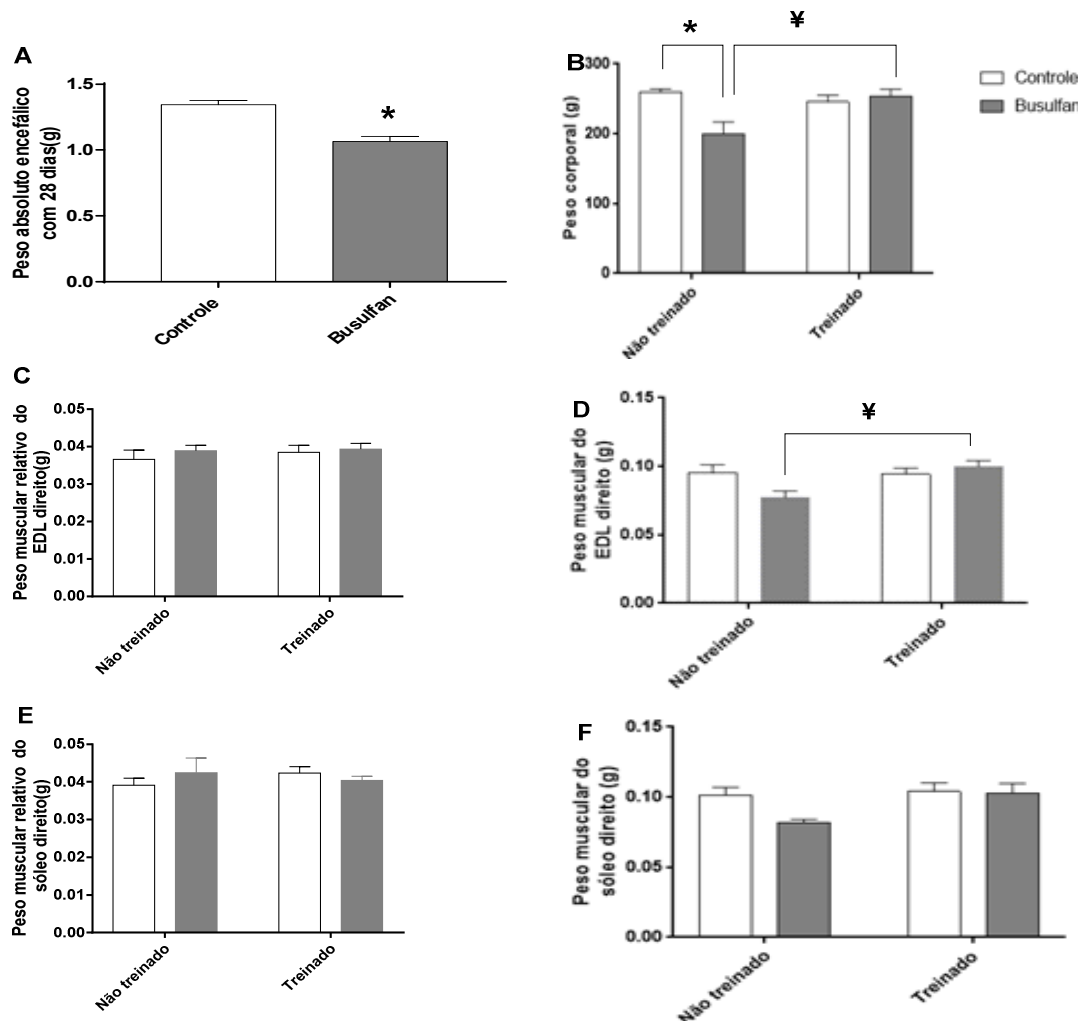


Figura 8: Pesagem de animais do grupo controles e busulfan. Aos 28 dias de vida Controle ($n^\circ/ninhada=5$) e Busulfan ($n^\circ/ninhada=7$) (A) Valores expressos em média $\pm$ erro padrão, $*P < 0,05$ Mann Whitney. Aos 65 dias de idade, ratos pertencentes aos grupos Controlem não treinado ($n^\circ/ninhada=5$), Controle treinado ($n^\circ/ninhada=7$), Busulfan não treinado ($n^\circ/ninhada=6$) e Busulfan treinado ($n^\circ/ninhada=5$), tiveram mensurado a pesagem corporal aos 65 dias (B), peso relativo do músculo EDL direito (C) peso absoluto do músculo EDL direito (E), peso muscular relativo do sóleo direito (E) e peso absoluto do músculo sóleo direito (F). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão, $*P < 0,05$ *CNT vs BNT, ¥BNT vs BT e \$CT vs BT ANOVA two way, seguido de teste Bonferroni.

6.8 ANÁLISE HISTOLÓGICA ENCEFÁLICA DO CÓRTEX MOTOR

Após análise do córtex motor aos 28° dias de vida, verificamos que a área do neurônio foi menor no grupo busulfan em relação ao grupo controle (C: $422,39 \pm 42,08$ m vs B: $280,73 \pm 35,18$ m, $p < 0,0009$) (Figura 9A). Porém, não foi encontrada diferença no perímetro do neurônio (Figura 9A), célula da glia/neurônio (Figura 89).

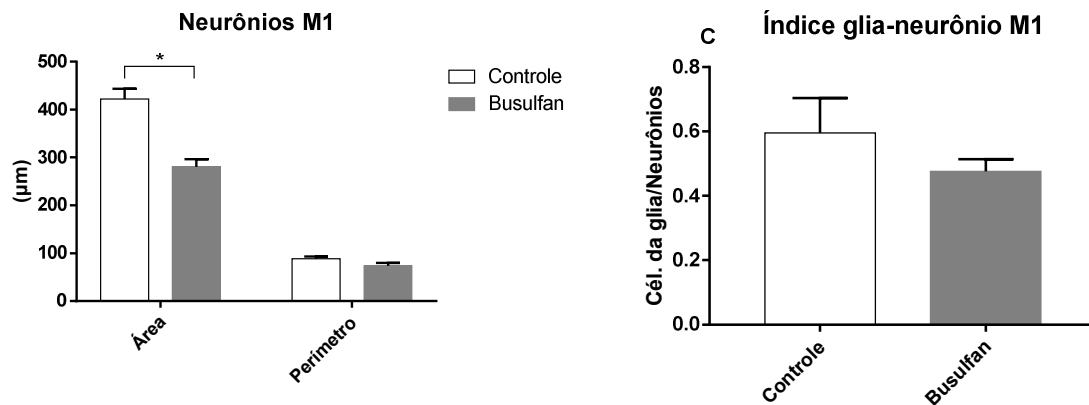


Figura 9: Análise histológica do córtex motor em ratos controles e busulfan. Aos 28° dias de idade, ratos pertencentes aos grupos Controle ($n^\circ/\text{ninhada}=5$), Busulfan ($n^\circ/\text{ninhada}=5$), área do neurônio (A), perímetro do neurônio (A), célula glia/neurônio (C). Valores expressos em média $\pm$ erro padrão, * $P < 0,05$ Teste t student.

7 DISCUSSÃO

O trabalho investiga alterações neuromotoras em ratos expostos a fármaco. Os animais passaram por exposição ao busulfan durante o período gestacional e o mesmo trouxe repercussões para a vida do animal, como diminuição da área do neurônio aos 28 dias de vida, menor peso corporal aos 8 dias de vida, um maior deslocamento no campo aberto aos 21 dias de vida, assim como maior tempo parado/número de paradas aos 8 dias de vida e maior tempo na área intermediária do campo aberto e menor tempo na área periférica mostrando dificuldade na locomoção. Após o treinamento de resistência, aos 62 dias de vida os animais expostos ao busulfan sem treino caminharam menos que os animais controle que não treinaram e o tratado treinado caminhou mais que o controle treinado no deslocamento rotacional, comprovando que os animais tratados apresentam dificuldade de locomoção mesmo após o treinamento de resistência, verificamos que os tratados sem treino ficaram mais tempo parados, quando analisamos o centro do campo aberto. Aos 14 e 17 dias de vida, o grupo microcefalia experimental não apresentou redução da força muscular. Consequentemente, aos 62 dias de vida, não foi observado influência do treinamento sobre a força muscular em animais com microcefalia. Os animais tratados treinados tiveram um aumento de massa muscular do EDL direito e aumento de peso corporal. O peso encefálico foi menor no grupo exposto ao busulfan aos 28 dias e vida.

O peso corporal aos 8 dias de vida no grupo de microcefalia experimental foi baixo, mostrando o efeito causado pelo fármaco ofertado no período gestacional das mães, foi capaz de repercutir ainda após o nascimento, mas, verificamos que o animal depois recuperou o peso corporal. Para avaliarmos os efeitos da microcefalia sobre a atividade locomotora, realizamos o teste de campo aberto. Nele observamos aos 8 dias de vida o animal busulfan ficou menos tempo parado/número de paradas no campo aberto, tendo a necessidade de apresentar um comportamento hipercinético. Verificamos também, que os animais tentaram sair do centro do campo aberto indo para a periferia, onde a mesma precisa tocar suas vibrissas no canto do local que se encontra, para assim se localizar (Kopp *et al.*, 1997). Porém os animais permaneceram mais tempo na área intermediária, esta dificuldade de ir para a periferia é devido à locomoção que se encontra prejudicada diante das sequelas presentes causadas pelo alquilante no período crítico da vida. A distância percorrida

pelos animais aos 21 dias de vida foi maior nos animais expostos ao busulfan, verificando que o animal por ter se deslocado mais, apresenta a característica de hiperatividade, característica de maior movimento realizado ao longo do dia, ficando menos tempo parado. Após o período de treinamento de resistência, foi realizada atividade locomotora aos 62 dias de vida, e foi verificado que os animais tratados não treinados apresentaram um deslocamento rotacional menor que o controle não treinado, mostrando o efeito do fármaco sobre as sequelas adquiridas após a exposição ao busulfan. Verificamos também que os animais tratados não treinados permaneceram mais tempo parados no centro do campo aberto, vemos que existe um problema na locomoção e após o treinamento vemos uma melhora nos indivíduos. A fraqueza muscular é um prejuízo motor comum em pacientes com doenças neurológicas (Sharp, *et al.*, 1997), dentre as sequelas apresentadas existe a diminuição da velocidade de marcha, em um estudo foi verificado que após treinamentos existiu a uma melhora no desempenho funcional (Morris *et al.*, 2004). Esses treinamentos que fortalecem os músculos apresentam benefícios na reabilitação de indivíduos com sequelas neurológicas e motoras (Morris *et al.*, 2004).

O teste de força realizado com 14 e 17 dias não mostrou diferença entre os animais. Os animais passaram pelo treinamento de resistência, e aos 62 dias de vida foi feito o teste de força novamente e os animais também não mostraram diferença estatística, e o esperado é que com o aumento da massa muscular ajudasse, e isso não aconteceu. Fato também encontrado no estudo de Zorzi *et al.* (2015), onde animais expostos a um antineoplásico e que passaram por 6 semanas de treino de resistência (natação com carga) não tiveram a força alterada. Este resultado mostra o efeito do fármaco permanece ao longo da vida prejudicando a força muscular dos indivíduos. Similarmente, Filho e colaboradores não observaram em humanos diferenças no desempenho funcional em indivíduos portadores de doenças neurológicas após treinamento por 9 semanas (Filho *et al.*, 2013). O desempenho funcional consiste na habilidade de gerar força a partir da força, ou seja, a potência (Allen *et al.*, 2009). Com isso, vemos que existe uma dificuldade maior em indivíduos com distúrbios neurológicos de melhorarem a força muscular após a lesão do sistema nervoso. Diferente do estudo de Santos (2018), realizado em crianças com microcefalia causada por ZIKV que após o treinamento para melhorar o desenvolvimento motor da criança com duração de 30 minutos diário por 5 semanas, verificaram que o objetivo foi alcançado, melhorando o aspecto motor

das crianças. As crianças precisam de estimulação precoce das funções motoras, tendo em vista que elas não apresentam noção de espaço, localização da parte do corpo, e também tonicidade e força muscular adequada (Barata *et al.*, 2010).

A prática de treinamento físico é capaz de promover benefícios físicos e psicológicos para crianças e adolescentes com distúrbio neurológico independente do comprometimento neuromuscular de cada indivíduo. Além dos problemas que o indivíduo apresenta decorrente das sequelas, podem-se ter doenças secundárias a ela, como obesidade e osteoporose, sendo a rotina de praticar treinos uma ajuda na prevenção das mesmas (Maher *et al.*, 2016). Verschuren *et al.* (2008), verificou em sua revisão sistemática, que um programa de treinamento de no mínimo 6 semanas, com frequência de três sessões por semana, pode aumentar o desempenho muscular em membros inferiores de pessoas com doenças neurológicas. E Damiano (2009) indica que é necessário ter um treinamento regular e contínuo. Diante disso, não foi verificada diferença no treino de resistência entre os animais, tendo em vista que o tempo foi curto (4 semanas), em relação aos grupos que estudam doenças neurológicas e seus benefícios realizados ao treinamento físico.

As barras paralelas e o rotarod servem para verificação da coordenação motora dos animais (Ding *et al.*, 2001^a; Fernández-Guasti, 2016), essas tarefas motoras (barras e rotarod) têm sido utilizadas em estudos que tratam dos efeitos do treinamento muscular complexo sobre a plasticidade neuronal em ratos normais (Black *et al.*, 1990; Kleim *et al.*, 1996; Isaacs *et al.*, 1992) bem como sobre déficit de desempenho motor em problemas neurológicos (Ding *et al.*, 2002 a). Diante disto, realizamos os dois testes. O de barras paralelas comprovou que os animais do grupo busulfan que não realizaram o treino de resistência, ficaram menos tempo parados nas barras paralelas. Como consequência, apresentavam mais tempo andando sobre as barras paralelas e também mais erros eram cometidos, demonstrando que a hiperatividade estava presente e que a coordenação motora dos animais não era boa. O treinamento não melhorou a coordenação motora dos animais portadores de microcefalia quando comparamos as análises entre o rato tratado não treinado e tratado treinado. Diferente do que se encontra em Cândido *et al.* (2017), que verificaram que o sedentarismo também provocou um maior número de erros entre os grupos de treinamento de resistência e muscular e que o ganho de resistência física e força muscular possibilitam melhora do desempenho motor. Os nossos dados de rotarod não mostraram benefício aos animais em relação a

coordenação e equilíbrio, após o treinamento de resistência. Como também foi visto no estudo de Fernández-Guasti (2016), que os animais após passarem por teste de nado forçado e após terem realizado o teste de rotarod, não mostraram diferenças entre si.

O desenvolvimento anormal do cérebro traduz uma das principais causas de distúrbio neurológico (Cattabeni *et al.*, 1997). Encontramos essa sequela nos nossos ratos, onde os animais que foram expostos ao fármaco apresentaram redução do peso encefálico aos 28 dias de vida (Woods, 2004). Furukawa *et al.*, (2007) também encontrou redução do peso encefálico absoluto nos seus animais que passaram pela exposição da mesma substância no mesmo período gestacional, o efeito do fármaco interferiu no crescimento encefálico. E com isso vemos refletir não apenas na redução do perímetro encefálico, mas sequelas em todo o corpo (Furukawa *et al.*, 2007).

Distúrbios neurológicos são deficiências na função predominantemente sensoriomotora, onde há mudança na conformidade do tônus muscular, na postura e na movimentação voluntária (Cargnin *et al.*, 2003), e comprimento muscular (Shepherd, 1998). A espasticidade pode ter a definição de “aumento na tensão do músculo quando ele é passivamente alongado, a qual é causada por um exagero do reflexo de estiramento muscular” (Kerem *et al.*, 2001). Mudança na musculatura esquelética secundária à alteração do tônus muscular dificulta o movimento voluntário (Cargnin *et al.*, 2003). Campbell (1996) verificou que com o devido tratamento, torna-se um modo mais fácil de diminuir as deficiências funcionais em muitas crianças, sendo o alvo de tratamento nos casos de doenças neurológicas, fazendo com que haja um aumento das habilidades do indivíduo e a diminuição das suas deficiências (Cargnin *et al.*, 2003), visto a deficiência motora, ritmo e equilíbrio presentes (Souza 2002). Como ajuda para isto, existe o treinamento físico, que aumenta a força muscular, a resistência aeróbia, auxilia na autonomia em locomoção, melhora na irrigação sanguínea, melhora na postura corporal, diminuição do débito cardíaco e da frequência cardíaca, maior absorção de oxigênio, criação de novas reações em reflexos ligados a estímulos e respostas (Tsutsumi *et al.* 2004). Verificamos isto com nossos resultados, o peso absoluto do músculo EDL direito em que o grupo busulfan não treinado foi menor em relação ao busulfan treinado o treino apresentou um efeito muito benéfico. De um modo geral, espera-se que os indivíduos que são colocados para realização de treinamento consigam obter

adaptações morfológicas significativas, ou seja, hipertrofia muscular (Lima *et al.*, 2006). A hipertrofia muscular esquelética é uma resposta à condição de exercício físico passado previamente contra uma resistência, o que provoca um aumento na síntese e/ou diminuição na degradação de proteínas miofibrilares (Glass, 2003) e como consequência promove aumento da massa muscular (Bodine, 2001). A autofagia é importante na homeostase celular e manutenção da massa muscular esquelética, provando sua importância no processo de hipertrofia do músculo (Bodine, 2001). No exercício crônico foi observada autofagia ativada em músculo sóleo através de aumento em LC3II/I (Pinto *et al.*, 2014). Durante o intervalo de treinamento existe a pausa que configura uma variável importante durante o treinamento (ACSM, 2002; Kraemer *et al.*, 2004), podendo ter influência diretamente nas mudanças fisiológicas e no desempenho das pessoas (Lima *et al.*, 2006). Existem estudos que apresentam intensidade e duração de pausa do treinamento podem ter uma mudança estatisticamente significativa em respostas hormonais (Kraemer *et al.*, 1990; 1993), cardiovasculares (Fleck, 1988) e metabólicas (Hakkinen *et al.*, 1993; Abdessemed *et al.*, 1999). Pausas de 90 a 120 segundos têm sido classificadas e prescritas como uma fase moderada para recuperação para inúmeros programas de treinamento de força (Kraemer *et al.*, 2003), assim como foi um dos requisitos do nosso trabalho para o treinamento resistência. E também repetições de 8 e 12 séries tem sido indicado para o aumento da massa muscular (Kraemer *et al.*, 2004), sendo o mesmo padrão utilizado no nosso estudo, que foi de 10 repetições no máximo por dia.

O nosso estudo demonstrou uma redução da área do neurônio do córtex motor nos animais expostos ao busulfan. O lobo frontal é basicamente formado por duas grandes áreas corticais: córtex motor e o córtex pré-frontal (Souza, 2014). O córtex motor está localizado na região do giro pré-central, entre o sulco central e o sulco pré-central, diferentemente do córtex pré-frontal que está situado na região anterior do lobo frontal, posterior ao sulco pré-central (Souza, 2014). O córtex motor se subdivide em córtex motor primário (M1 ou área 4 de Brodmann) e áreas pré-motoras (Souza, 2014). O córtex pré-motor, área motora suplementar, córtex pré-frontal dorsolateral e o M1 são áreas presentes no lobo frontal que estão mais associadas à aprendizagem motora (Lang *et al.*, 2005). O córtex motor é responsável por coordenar a ativação dos músculos de forma sinérgica representados na parte cortical, junto com estruturas presentes na medula espinhal, com a finalidade que a

ação motora seja realizada de forma adequada e precisa (Oza *et al.*, 2014). Estudos mostram que durante a realização de movimentos voluntários o córtex motor e áreas pré-motoras são ativadas, sendo associada a diferentes parâmetros motores, força, posição, direção e velocidade de movimentos da articulação (Fetz 2007; Stark *et al.*, 2008). Segundo Verschuren *et al.* (2008), alguns produtos são capazes de promover a apoptose nas células neuroepiteliais. Causando com isso a morte exagerada de neurônios no desenvolvimento do córtex cerebral (Brill *et al.*, 1999). E com isso, pressupomos que o busulfan pode induzir a parada do ciclo celular na fase G1/G2 e danos no DNA, causando apoptose e inibição mitótica no neuroepitélio (Furukawa *et al.*, 2007). A redução do desenvolvimento de neurônios recém-nascidos pode causar falta no número de células para uma futura histogênese e organogênese normal, esta ausência pode cursar com microcefalia (Furukawa *et al.*, 2007). Porém ainda não se tem informação necessária dos genes ativados quando ocorre a apoptose induzida pelo busulfan (Furukawa *et al.*, 2007, Ueno *et al.*, 2002a). Com isso, observamos que as sequelas presentes causadas pelo tamanho reduzido da área do neurônio nos animais expostos ao busulfan podem ser inúmeras, como atraso na ontogênese de reflexos nas características somáticas e as demais sequelas presentes no estudo.

O trabalho demonstrou que insultos no período gestacional podem trazer repercussões para a vida inteira do indivíduo como foi o caso do fármaco busulfan utilizado no período gestacional de ratas repercutindo na vida do animal em todos os aspectos. Acredita-se que o treinamento de resistência como uma técnica para melhorar as sequelas presentes foi realizada em um tempo curto, se tivesse sido realizado em um tempo maior, os benefícios teriam sido mais relevantes e demonstrado uma melhora na força, locomoção, coordenação e hiperatividade dos indivíduos.

8 CONCLUSÃO

O busulfan foi capaz de reproduzir sequelas encontradas em crianças com microcefalia.

O treinamento de resistência durante 4 semanas foi uma ação terapêutica que apresentamos, ele foi capaz de promover aumento da massa muscular e peso corporal nos animais, e comprovamos que não houve melhoras na coordenação.

REFERÊNCIAS

ADLARD, B. P.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. 3. Development of four enzymes in the brains of normal and undernourished rats. **Brain Res**, v. 339 28, n. 1, p. 97-107, apr 1971.

ABDESSEMED, D.; DUCHÉ, P.; HAUTIER, C.; *et al.* Effect of recovery duration on muscular power and blood lactate during the bench press exercise. **Int J Sports Med**, v.20, p.368-73, aug 1999.

ALBUQUERQUE, M.F.P.M.; SOUZA, W.Z.; ARAÚJO, T.V.B. *et al.* Epidemia de microcefalia e vírus Zika: a construção do conhecimento em epidemiologia. **Cad. Saúde Pública**, v.34, n.10, Out 2018.

ALLEN, N. E.; CANNING, C.G.; SHERRINGTON, C. *et al.* Bradykinesia, muscle weakness and reduced muscle power in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 24, n. 9, p. 1344-51, 2009

AMARAL, L. A. Conhecendo a Deficiência (em Companhia de Hércules). Série Encontros com a Psicologia. São Paulo: Robe Editorial. 1995.

AMENGUAL, E. L esport e la paralisi cerebral. **Catalunha: Generalitat de Catalunya**, 1º ed. 1992.

ANDRADE, A.; LUFT, C.B.; ROLIM, *et al.* O desenvolvimento motor, a maturação das áreas corticais e a atenção na aprendizagem motora. **Revisão Digital –Buenos Aires**, ano 10, n.78, nov 2014.

ANGELIDOU, A.; MICHAEL, Z.; HOTZ, A. *et al.* Is There More to Zika? Complex Cardiac Disease in a Case of Congenital Zika Syndrome. **Neonatology**, v.113, p.:177–182, 2018.

ANTONIO-SANTOS, J.; FERREIRA, D.J.; GOMES, G.L.C.; *et al.* Resistance physical training alters the proportion of skeletal muscle fibers but not brain neurotrophic factors in young rats. **J Res. Cond.** v.30, n.1, p.: 3531-3538, dez 2016.

AMERICAN COLLEGE OF SPORTS MEDICINE. A quantidade e o tipo recomendados de exercícios para o desenvolvimento e a manutenção da aptidão cardiorrespiratória e muscular em adultos saudáveis. *Rev Bras Med Esporte* [online]. 1998, vol.4, n.3 [cited 2018-12-30], pp.96-106.

American College of Sports Medicine-ACSM. Position stand on progression models in resistance training for healthy adults. Exercise and physical activity for older adults. *Med Sci Sports Exerc* v.34, p.364-80, 2002.

ARAGÃO R.D.A., S.; RODRIGUES, R.M.A.B.; DE BARROS, K.M.F. T.; *et al.* Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents- -a reproducibility study. **J Neurosci Methods**, v. 195, n. 2, p. 216-21, Feb 15 2011.

ARAGÃO R. S. Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. **Acta Physiol (Oxf)**. v.210, n.1, p.:70-83, jan 2014.

ARAGÃO, M.F.V. *et al.* Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **BMJ**. v.353, apr 2016.

Bobath B. Adult Hemiplegia: Evalution and Treatment. 3nd. Oxford: **Butterworth Heinemann**; 1970.

BALDWIN M, HADDAD F. Effects of different activity and inactivity paradigms on myosin heavy chain gene expression in striated muscle. **J Appl Physiol**. v.90, n.1, p.:345-57, jan 2001.

BARATA, Livia Fernandes; BRANCO, Anete. OS DISTÚRBIOS FONOARTICULATÓRIOS NA SÍNDROME DE DOWN E A INTERVENÇÃO PRECOCE. **Revista CEFAC**, v. 12, n. 1, 2010.

BARONE, R.; MACALUSO, F.; SANGIORGI, C.; *et al.* Skeletal muscle Heat shock protein 60 increases after endurance training and induces peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α expression. **Sci Rep** v.6, p.19781, jan 2016.

BARROS, K.M. *et al.* A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutritional neuroscience**.v.9, n.1-2, p.:99-104, Fev-apr2006.

BARKER, P.D.; MAUK, M.R.; MAUK, A.G. Difficulties of overseas students in social and academic situations. **Biochemistry**. v.30, n.9, p.2377–2383, 1991.

BARZON, L.; Pacenti, M.; Franchin, E. *et al.* Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. **Euro Surveill**. v.21, n.32, agos 2016.

BAX, M.; Goldstein, M.; Rosenbaum, P. *et al.* Executive Committee for the Definition of Cerebral Palsy. Proposed definition and classification of cerebral palsy April 2005. **Dev Med Child Neurol**. v.47, n.8, p.:571-6, aug 2005.

BERG B, O. Child neurology: a clinical manual. 2nd ed. Philadelphia: J. B. Lippincott Company v.1-26, 1994.

BELL, T.M.; CAMPO, E.J.; NARANG, H.K. Infecção por vírus zika do sistema nervoso central de camundongos. **Arch Gesamte Virusforsch** v.35, p. 183–193, 1971.

BÍBLIA. A.T. Só Deus resgata Israel. Português. Bíblia Sagrada: Harpa Cristã, Edição Comemorativa 100 IEADPE. Edição Revisada e Corrigida. Bangu - Rio de Janeiro: João Ferreira de Almeida, 2018. P.498.

BISHOP, J.B.; Wassom, J.S. Toxicological review of busulfan (Myleran). **Mutat Res.** v.168, n.1, p.: 15–45, jul 1986.

BODINE, S.C.; STITT, T.N.; GONZALEZ, M. *et al.* (2001) Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo. **Nat Cell Biol** 3(11):1014–1019.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Atenção à Saúde do Recém-Nascido. **Guia para os profissionais de saúde, cuidados gerais**. 2.ed. vol.1.Brasília-DF,2012.

BRASIL.MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde confirma relação entre vírus Zika e microcefalia, 28 de novembro de 2015. [Internet]. Nota à imprensa. 2015 [cited 2015 Dec 6]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/21014-ministerio-da-saude-confirma-relacao-entre-virus-zika-e-microcefalia>.

BRASIL. Associação Brasileira de fisioterapia neurofuncional. Rio de Janeiro, 29 de Janeiro de 2016.

BRASIL.Sistema COFFITO/CREFITOs. Diagnóstico: Microcefalia. E agora?. 2016, 12 p. Disponível em: http://www.coffito.org.br/site/files/noticias/2016/Cartilha_Microcefalia_Final.pdf.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016. https://docs.wixstatic.com/ugd/3293a8_e4cd0131bb4143a2ac2e4ceefd3a09c0.pdf.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/Ou Alterações do sistema nervoso central (SNC), Brasília-DF, versão 2. 2016.

BRASIL. Associação Brasileira de fisioterapia neurofuncional. Rio de Janeiro, 29 de Janeiro de 2016.

BRASIL. DIRETRIZES DE ESTIMULAÇÃO PRECOCE Crianças de zero a 3 anos com Atraso no Desenvolvimento Neuropsicomotor Decorrente de Microcefalia. Brasília-DF, 2016.

BRASIL. Boletim Epidemiológico. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 30 de 2018. v.49, n.39, Set. 2018.

BOLBANABAD, H.M.; ANVARI, E.; REZAI, M.J. *et al.* Amelioration of cerebellar dysfunction in rats following postnatal ethanol exposure using low-intensity pulsed ultrasound. **J Chem Neuroanat.** v.81,p.71-75. Apr 2017.

BABENKO, O.; KOVALCHUK, I.; METZ, G.A. Stress-induced perinatal and transgenerational epigenetic programming of brain development and mental health. **Neurosci Biobehav Rev.** v.48, p.70-91, jan 2015.

Borrelli, E.; Nestler, E.J.; Allis, C.D. *et al.* Decoding the epigenetic language of neuronal **plasticity**. **Neuron**, v. 60, n. 6, p. 961-974, dec 2008.

BUGGIA, I.; LOCATELLI, F.; REGAZZI, M.B; ZECCA, M. (1994). Bussulfano. **Annals of Pharmacotherapy**, v.28, n.9, p.1055-1062. 1994.

CADENA- BURBANO, E.V.; Cavalcanti, C.C.L.; Lago, A.B. *et al.* A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. **Nutritional Neuroscience**, v.1, p.12.Jul 2017.

CAMPBELL. Cirurgia ortopédica de Campbell. 8 ed. São Paulo, **Elsevier**, 1996.

CAMPANOZZI, A.; CAPANO, G.; MIELE, E.; *et al.* Impact of malnutrition on gastrointestinal disorders and gross motor abilities in children with cerebral palsy. **Brain Dev**, v.29, n.1, p.25-9. Jan 2007.

CAMPOS, R.M.M. Podem a ontogênese de reflexos e o consumo alimentar ser alterados de modo sexodependente por inibição neonatal da recaptação serotoninérgica? Um estudo experimental da plasticidade fenotípica. Dissertação de mestrado, UFPE, RECIFE, 2005.

CATTABENI, F.; DI LUCA, M. Developmental models of brain dysfunctions induced by targeted cellular ablations with methylazoxymethanol. **Physiol. Rev.** v.77, n.1, p.199-215. Jan 1997.

CÂNDIDO, B.A.; GOMES, R.M.; COTA, V.R. *et al.* Análise da eficácia de dois protocolos de treinamento físico no desempenho motor de ratos. **Revista da Biologia**, v.17, n.1, p.:6-12, ago 2015.

CHAN, K.W.K; WATANABE, S.; KAVISHNA, R.; *et al.* Animal models for studying dengue pathogenesis and therapy. **Antiviral Research**. v. 123, p. 5–14. 2015.

CARGNIN, A.P.M.; MAZZITELI, C. Proposta de Tratamento Fisioterapêutico para Crianças Portadoras de Paralisia Cerebral Espástica, com Ênfase nas Alterações Musculoesqueléticas. **Rev. Neurociências** v.11, n.1, p.34-39, 2003.

COLETTI D, BERARDI E, AULINO P, *et al.* Substranges de camundongos consanguíneos diferem em sua atividade física como um comportamento. **Scientific World Journal**, 2013.

COLETTI D. Chemotherapy-induced muscle wasting: an update. **Eur J Transl Myol**. v.28, n.2, p. 7587, apr 2018.

CUGOLA, F.R. FERNANDES, I.S.; RUSSO, F.B. *et al.* The Brazilian Zika Virus Strain Causes Birth Defects in experimental Models. **Nature** p.: 267–271, 2016.

DAMIANO, D. L. Rehabilitative therapies in cerebral palsy: the good, the not as good, and the possible. **J Child Neurol.** v. 24, n. 9, p. 1200-1204, Sep. 2009.

DAMRAUER, J.S.; STADLER, M.E.; ACHARYYA, S. *et al.* Desgaste muscular induzido por quimioterapia: associação com NF-kB e caquexia por câncer. **Eur J Transl Myol**, v.28, p.158-66, 2018.

DELP, M.D.; DUAN, C. Composition and size of type I, IIA, IID/X, and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. **J Appl Physiol.** v.80, n.1, p.:261-70, jan 1996.

DESESSO J.M. In: Developmental and reproductive toxicology. A practical approach. 2nd ed. Hood R.D. **Taylor & Francis. Boca Raton.** P 147-197.2005.

DICK, G.W.A.; KITCHEN, S.F.; HADDON, A.J. Vírus Zika (I) Isolations and serological specificity. **Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene.** v.46, n. 5. September, 1952.

DICK, G. W . Trans R Soc Trop Med Hyg. **Patogenicidade e propriedades físicas,** v.46, n.5, p.: 521-34, set 1952.

DING Y.; ZHOU, Y.; LAI, Q. *et al.* Impaired motor activity and motor learning function in rat with middle cerebral artery occlusion. **Behav Brain Res** v.132: p.29–36, 2002^a.

DING Y.; LI, J.; LAI, Q. *et al.* Motor balance and coordination training enhances functional outcome in rat with transient middle cerebral artery occlusion. **Neuroscience** v.123, p.667–674, 2004.

DOBBING, J.; SMART, J. L. Vulnerability of developing brain. VI. Relative effects of foetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Biol. Neonate** v.19, p. 363-378, 1971.

DUARTE, G.; MORON, A.F.; TIMERMAN, A. *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women and Microcephaly. **Rev Bras Ginecol Obstet.** v.39, n.5, p.:235-248, Ma 2017.

EICKMANN, S.H. *et al.* Síndrome da infecção congênita pelo vírus Zika. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.32, n.7, jul, 2016.

FAUROUP, B.; CLEMENT, A.; TOUMIER G. Pulmonary toxicity of drugs and thoracic irradiation in children. **Rev Mal Respir.** v.13, n.3, p.: 235–242. Jul 1996.

FERREIRA, T.S. A contribuição do treinamento de força na reabilitação neuromotora de idosos vítimas de acidente vascular cerebral. **Anais do VI Congresso Goiano de Ciências do Esporte**, jun 2009.

FERNÁNDEZ-GUASTI, A.; OLIVARES-NAZARIO, M.; REYES, R. *et al.*, Sex and age differences in the antidepressant-like effect of fluoxetine in the forced swim test, **Pharmacol Biochem Behav**, n.152, p.81-89. Jan 2016.

FETZ, E. E. Volitional control of neural activity: implications for brain–computer interfaces. **J Physiol**, v.579,n.3: p.571–579, mar 2007

FLECK, S.J. Cardiovascular adaptations to resistance training. **Med Sci Sports Exerc**; v.20, p.146-51,1988.

FLECK S. J.; KRAEMER W. J. Fundamentos do Treinamento de Força Muscular – Fisiologia muscular. Porto Alegre: Artmed, 1999.

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

FILHO, A.V.M. efeitos do treinamento de força sobre a bradicinesia, força muscular e desempenho funcional em indivíduos com doença de parkinson. (trabalho de dissertação), Brasília, 2013.

FILHO, C.A.A.M.; ALVES, C.R.R.; SEPÚLVEVA, C.A. Influência do exercício físico na cognição: uma atualização sobre mecanismos fisiológicos. **Rev Bras Med Esporte** – v.20, n.3, jun, 2014.

FOX, M.W. Reflexo-ontogenia e desenvolvimento comportamental do camundongo. **Anim Behav**, v.13, p.234-241, 1965.

FURUKAWA, S.; USUDA, K.; ABE, M.; OGAWA, I. Microencephaly and microphthalmia in rat fetuses by busulfan. **Histol Histopathol**, v.22, p389-397, 2007.

GALTON, D.G.A. Myleran in chronic myeloid leukemia: results of the treatment. **Lancet**, v.1, p.208-13, 1953.

GARCIA, L.P. Epidemia do vírus zika e microcefalia no Brasil: emergência, evolução e enfrentamento. Brasília, fevereiro de 2018.

GARLAND T, *et al.* The biological control of voluntary exercise, spontaneous physical activity and daily energy expenditure in relation to obesity: human and rodent perspectives. **The Journal of experimental biology**.v.214, n.2, p.:206-29.jan 2011.

GUEDES, D. P. Controle do peso corporal: composição corporal, atividade física e nutrição. Londrina: Mediograf, 1998.

GUEDES, D.J. Molecular mechanisms modulating muscle mass. **Trends Mol Med** v.9, n.8, p.344–350, 2003.

GOMES, R.C.T.N.; BARROS, K.B.N.T.; GOMES, E.L. *et al.* Efeitos do treinamento resistido na força de indivíduo com paralisia cerebral. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício**, São Paulo. v.9. n.55. p.545-554. Set./Out. 2015.

GOURINAT, A.C.; O'CONNOR, O.; CALVEZ, E. *et al.* Detection of Zika virus in urine. **Emerg Infect Dis.** v.21, p:84-6, jan 2015.

HAKKINEN K, PAKARINEN A. Acute hormonal responses to two different fatiguing heavy-resistance protocols in male athletes. **J Appl Physiol**, v.74, p.882-7, feb 1993.

HAUSER, R.; ZESIEWICZ, T. A doença de Parkinson: perguntas e respostas. São Paulo: Novartis, 2001.

HIROUX, C.; VANDOORNE, T.; KOPPO, K. *et al.* Physical Activity Counteracts Tumor Cell Growth in Colon Carcinoma C26-Injected Muscles: An Interim Report. **Eur J Transl Myol**, v.26, n.2, jun 2013.

HORNBERGER, T.A.J.R.; FARRAR, R.P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can J Appl Physiol**, v.29, n.1, p.16-31, feb 2004.

ISHIAHARA, A.; TAGUCHI, S. Histochemical differentiation of fibres in the rats slow na fast twitc muscle. **Jpn J physiol**, v.41, n.2, p.251-258,1991.

JACOBSON, M. Development specification and diversification of neuronal connection.

In: Schmitt, F.O. (Ed.), The Neurosciences: Second Study Program. The Rockefeller, p. 531974.

JAMON M. The early development of motor control in neonate rat. **Comptes Rendus Palevol**, v.5, n.3-4, p.:657-66, mar-apr 2006.

JERÔNIMO, M.S.; PONTES FILHO, N.T.; MELO JUNIOR, M.R. *et al.* Efeitos da exposição pré-natal e pós-natal ao etanol no córtex cerebral de ratos: um estudo do neurópilo. **J Bras Patol Med Lab**, v. 44, n. 1, p. 59-64, fev 2008.

JIRTLE, R.; SKINNER, M. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews: Genetics**, v. 8, n. 4, p. 253-262, 2007.

JONES, M.W.; BASS, W.T. Fetal alcohol syndrome. **Neonatal Netw.** v.22, n.3, p:63-70, 2003.

JOHNSTON, M.V.; HOON, J.R. A.H. Cerebral palsy. **Neuromolecular Med.** v.8, n.4, p.435- 50. 2006.

JULANDER, J.G. Animal models of yellow fever and their application in clinical research. **Curr Opin Virol**, v.18, p.:64-9, jun 2016.

LACERDA, D.C. FERRAZ-PEREIRA, K.N.; BEZERRA DE MORAIS, A.T. *et al.* Oro-facial functions in experimental models of cerebral palsy: a systematic review. **Journal of Oral Rehabilitation**, v.44, p.; 251–260, apr 2017.

LANG, N.; SIEBNER, H.R.; WARD, N.S. *et al.* How does transcranial DC stimulation of the primary motor cortex alter regional neuronal activity in the human brain? . **European Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 2, p. 495–504, 2005.

LARA, M. A. P. Algumas propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas submetidas a um modelo de hipoatividade e tratadas com exercitação. 2003. 101f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo: USP, 2003.

LEITE, I.C.; VALENTE, J.G.; SCHRAMM, J.M.A. *et al.* Carga de doença no Brasil e suas regiões, 2008. **Cad Saude Pública**. v.31, n.7, p.1551-64, jul 2015.

LO, TYM.; MCPHILLIPS, M.; MINNS, R.A. *et al.* Cerebral síndrome siguiente impacto y injur cabeza no accidental (Nahi) rehabilitación. **Pediatric**, v.6, p. 47-55, 2003.

LOBO, M.O.; KRIER, F.C.; TIBANA, R.A. Epigenética e exercício físico: influência em transtornos de ansiedade? **J.Heath biol sci.** v.6, n.2, p.182-188.2018.

Hales, C.; Barker, D.J. The thrifty phenotype hypothesis. **Br Med Bull.**v.60, n.1, p.5-20, 2001.

KEREM, M.; LIVANELIOGLUA, A. TOPCU, M. Effects of Johnstone pressure splints combined with neurodevelopmental therapy on spasticity and culaneus sensory inputs in spastic cerebral palsy. **Dev Med Child Neurol**, v.43, p.307-12, may 2001.

KRAEMER, W.J.; MARCHITELLI, L.J.; GORDON, S.E. *et al.* Hormonal and growth factor responses to heavy resistance exercise protocols. **J Appl Physiol**, v.69, p.1442-50, oct 1990.

KRAEMER. W.J.; FLECK, S.J.; DZIADOS, J.E. *et al.* Changes in hormonal concentrations after different heavy-resistance exercise protocols in woman. **J Appl Physiol**, v.75, p.594-604, aug 1993.

KRAEMER, W.J.; HAKKINENN, K.; TRIPLETT-MCBRIDE, N.T. *et al.* Physiological changes with periodized resistance training in women tennis players. **Med Sci Sports Exerc** 2003; v.35, p.157-68.

KRAEMER, W.J.; RATAMESS, N.A. Fundamentals of resistance training: progression and exercise prescription. **Med Sci Sports Exerc**, v.36, n.1, p.674-88, jan 2003.

KANDEL, E.; SCHAMARTZ, J. Princípios da Neurociência.São Paulo: Manole,2003.

KODITUWAKKU PW. Neurocognitive profile in children with fetal alcohol spectrum disorders. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev.**, v.15, n.3, p.218-24, 2009.

KOLB, B.; WHISHAW, I. Q.Neurociências do comportamento.São Paulo:Manole, 2002.

KRAUSE, G.H.; KOROLEVA, Y.; DALLING, J.W. *et al.* Acclimation of tropical tree seedlings to excessive light in simulated tree-fall gaps. *Plant. Cell and Environment*, v.24, p.1345–1352, dec 2001.

KRAUSS, M.J.; MORRISSEY, A.E.; WINN, H.N.; *et al.* Microcephaly: an epidemiologic analysis. *Am J Obstet Gynecol*, v.188, n.6, p.1484-9, jun 2003.

MA, K.; MALLIDIS, C.; ARTAZA, J. *et al.* Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v.281 n.6, p.1128-36, dec 2001.

MAIOR, A. S.; ALVES, A. A contribuição dos fatores neurais em fases iniciais do treinamento de força muscular: uma revisão bibliográfica. *Motriz*, v. 9, n. 3, p. 161-168, set/dez 2003.

MARCUS, R. *et al.* Osteoporosis and exercise in women. *Med. Scie. Spt. Exerc.*, v.6, p.163-165, 1991

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

MARINHO, F.; ARAÚJO, V.E.M.; PORTO, D.L. *et al.* Microcefalia no Brasil: prevalência e caracterização dos casos a partir do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc), 2000-2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v.25, n.4, p.701-712, 2016.

MATSUDO, S.M.; MATSUDO, V.K.R.; NETO, T.L.B. *et al.* Evolução do perfil neuromotor e capacidade funcional de mulheres fisicamente ativas de acordo com a idade cronológica. *Rev Bras Med Esporte*, v.9, p.:365-376, nov-dec 2003.

MARQUES, M.R.; *et al.* Efeitos benéficos do enriquecimento ambiental precoce no desenvolvimento motor e plasticidade da medula espinhal em um modelo de rato com paralisia cerebral. 2013.

MCDONNELL-DOWLING, K.; KELLY, J.P. As conseqüências da exposição pré-natal e / ou pós-natal à metanfetamina no desenvolvimento neonatal e comportamento na prole de ratos. **Int J Dev Neurosci**. v.47, p.147-156, dec 2015.

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

MOREIRA, D.; RUSSO, A. F. Cinesiologia Clínica e Funcional. São Paulo: Editora Atheneu, 2004.

MORGANE, P.J.; Austin La Franu, R.; Bronzino, J. *et al.* Desnutrição pré-natal e desenvolvimento do cérebro. **Neurosci Biobehav Rev** 1993: v.17, p.: 91-128, 1993.

MUNARETTO, P. Análise da interferência da equoterapia na simetria corporal de paciente portador de paralisia cerebral do tipo hemiparético espástico: um estudo de caso comparativo, (Trabalho de Conclusão de Curso), 2006.

MUSSO, D.; NAHN, T.; ROBIN, E. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, **Euro Surveill**, v.19, n.14, abr 2014.

MUSSO, D.; ROCHE, C.; NHAN, T.X. *et al.* Detection of Zika virus in saliva. **Clin Virol**. v.68, p.:53-5, jul 2015.

MORRIS SL, DODD KJ, MORRIS ME. Outcomes of progressive resistance strength training following stroke: a systematic review. **Clin Rehabil**, v.18, n.1, p.27-39, feb 2004.

MOTZ, B. A.; ALBERTS, J. R. The validity and utility of geotaxis in young 430 rodents. **Neurotoxicol. Teratol**, v. 27, n. 4, p. 529-33, jun 2005.

NICHOLLS, J., MARTIN, A., WALLACE, B. From Neuron to Brain, 3rd ed. Sinauer Associates Inc., Massachusettes, 1992.

NOBACK, C.R.; EISENMAN, L.M. Alguns efeitos da desnutrição protéico-calórica no desenvolvimento do sistema nervoso central do rato. **Anat Rec**, v.201, p.: 67-73,1981.

NUNES, M. L.; CARLINI, C.R.; MARINOWIC, D. *et al.* Microcefalia e vírus Zika: um olhar clínico e epidemiológico do surto em vigênciano **Brasil, J. Pediatr**, v. 92, n. 3, p. 230-240, Jun 2016.

OAKHILL, A.; GREEN, I.D.; KNOWLSON, G.T. *et al.* Busulphan lung in childhood. **J Clin Pathol**. V.34, p.: 495–500, may 1981.

OHIRA, T.; ANDO, R.; ANDOH, R. *et al.* Distribution and sequence of pyknotic cell in rat fetuses exposed to busulfan. **J Toxicol Pathol**, v.22, n.2, p.: 167–171, set 2009.

OHIRA, T.; ANDO, R. OKADA, Y. *et al.* Sequence of busulfan-induced neural progenitor cell damage in the fetal rat brain. **Exp Toxicol Pathol**, v.65, n.5, p.: 523–530, jul 2013.

OLIVEIRA, A.I.A.; PAIXÃO, G.M.C., *et al.* Brinquedos adaptados para crianças com paralisia cerebral. **Revista do Nufen**, v.1, p. 171-186, 2009.

OLIVEIRA, F.L.C.; OLIVEIRA, A.S.B.; SCHMIDT, B. Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1a e 2a gerações. **Jornal de Pediatria**, v.75, n.5, 1999.

OGOH S, AINSLIE PN. Cerebral blood flow during exercise: mechanisms of regulation. **J Appl Physiol.**, v.107, n.5, p.1370-80, nov 2009.

O'SULLIVAN. S.B.; SCHIMITZ, T.J. Fisioterapia: Avaliação e Tratamento. 4. ed. São Paulo: Manole, 2004. PERRY, J. Análise de marcha. São Paulo: Manole, 2004.

OZA,C.S.;GISZTER,S.F. Plasticity and alterations of trunk motor cortex following spinal cord injury and non-stepping robot and treadmill training. **Exp Neurol.** v.256, p.57-69, jun 2014.

PAIVA, M.S.; NARDIN, M.; STREIFF, T. *et al.* Benefícios do Exercício Físico para Crianças e Adolescentes com Paralisia Cerebral: Uma Revisão Bibliográfica. **Rev. Acta Fisiátrica.** v.17., n.4, p. 175-179, dez 2010.

PAXINOS, G. and WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd Edition, Academic Press, New York, 1986.

PETERSEN, L. R., JANIESON, D.J.; POWERS, A.M. *et al.* Zika virus. **New Engl. J. Med.** V.374, p.1552–1563, mar 2016.

PETTE, D.; STARON, R.S. Transitions of muscle fiber phenotypic profiles. **Histochem cell biol**, v.115, n.5, p.: 359-372, may 2001.

PIERINE DT, NICOLA M, OLIVEIRA EP. Sarcopenia: alterações metabólicas e consequências no envelhecimento. **R. bras. Ci. e Mov.**, v.17, n.3, p.96-103, nov 2009.

PIGNA E, BERARDI E, AULINO P, *et al.* Aerobic Exercise and Pharmacological Treatments Counteract Cachexia by Modulating Autophagy in Colon Cancer. **Sci Rep** v.31;6:26991, may 2016.

PINTO, G.H. Sinalização autofágica e níveis de miostatina em modelo de hipertrofia cardíaca fisiológica em camundongos. (Dissertação de mestrado) 2014.

PIOVESAN, R.F. uma revisão sobre a plasticidade do músculo esquelético: expressão de isoformas de cadeia pesada de miosina e correlação funcional. **Fisioter. Mov., Curitiba**, v. 22, n. 2, p. 211-220, abr./jun. 2009.

PUNKT,K; NAUPERT,A.; ASMUSSEN,G. Differentiaton os rat skeletal muscle fibres during development ang ageing. **Act Histochem**, v.106, n.2, p.145-154, 2004.

PRATA, D.P. As bases biológicas da Esquizofrenia. IMPRENSA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA 2014.

REIS, J.C.; SANTOS, P.S.; BARATA, M.F.O. *et al.* Abordagem da terapia ocupacional a bebês com microcefalia: uma experiência no estágio curricular. **Rev. Interinst. Bras. Ter. Ocup**, v.2, n.1, p.212-227, 2018.

RICE, D.; BARONE, S.J.R. Environ Health Perspect. 2000 Jun; 108(Suppl 3): 511–533.

RIGGS, A. X inactivation, differentiation and DNA methylation. **Cytogenetics Cell Genet**, v. 14, n. 1, p. 9-25, 1975.

RIET-CORREA, F.; RIET-CORREA, G.; SCHILD, A.L. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e eqüídeos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 22, n. 4, p. 161-168, Oct. 2002.

ROBERTS, M.R.; BITTMAN, K.; LI, W.W. *et al.* The *Flathead* Mutation Causes CNS-Specific Developmental Abnormalities and Apoptosis. **Journal of Neuroscience**, v.20, n.6, p. 2295-2306, mar 2000.

ROCHEL, H.; TRICOLI, V. & UGRINOWITSCH, C. Rev. bras. Educ. Fís. Esporte, São Paulo, v.25, p.53-65, dez. 2011.

RUCHINSKAS, R.A.; SINGER, H.K.; REPETZ, N. Cognitive status and ambulation in geriatric rehabilitation: walking without thinking? Arch Phys Med **Rehabil**, v.81, n.9, p.:1224-8, set 2000.

SADLER, T.W. langman embriologia médica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

SANTOS, Í. G. B. D. Aplicabilidade do Protocolo GAME (metas, atividades e ganhos motores) no desempenho motor de crianças com síndrome congênita do zika vírus: estudo de caso. Trabalho de TCC, Largato/SE, 2018.

SASCO, A.J.; PAFFENBARGER, R.S.J.R; GENDRE, I. The role of physical exercise in the occurrence of Parkinson's disease. **Arch Neurol**, v.49, n.4, p.:360-365, apr1992.

SHARP SA, BROUWER BJ. Isokinetic strength training of the hemiparetic knee: effects on function and spasticity. *Arch Phys Med Rehabil*. v.78, n.11, p.1231-6, nov 1997.

SCOTT, J.P Critical periods in organizational process. In: FALKENER, F.; TANNER, J.M., eds. Human growth. New York, Plenum, 1986.

SHEPHERD RB. Fisioterapia em pediatria. 3 ed. São Paulo, Livraria Santos, pp. 224-77, 1998.

SIKIC, B. L. Fármacos Antineoplásicos. In: CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. Farmacologia moderna com aplicações clínicas. Rio de Janeiro: GuanabaraKoogan, cap. 56, p.601-618, 2005.

SILVA, H. J.; BARROS, K.M.F.T.; CUNHA, D.A. *et al*. Malnutrition and Somatic Development: Application of Protocol of Mensuration to Evaluation of Indicators of Wistar Rats. **Int. J. Morphol.**, v. 24, n. 3, p. 469-474, 2006.

SINCLAIR, K.; LEA, R.; REES, W. *et al*. The developmental origins of health and disease: current theories and epigenetic mechanisms. **Society of Reproduction and Fertility supplement**. v.64, n.1, p.425-43, fev 2007.

SMART JL, DOBBING J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat VI. *Brain Res*, v.33 n.2, p.303-14, oct 1971.

SOUZA, A. L. F. Psicomotricidade nas atividades de vida diária (avd's) do hemiparético. 2002. 45f. Monografia (Pós-graduação em page 3 / 4 Psicomotricidade) - Universidade Cândido Mendes. Rio de Janeiro, 2002.

SOUZA, T.A. APRENDIZAGEM MOTORA: o papel do córtex motor primário. Dissertação de mestrado, Belo horizonte, 2014.

STARK, E.; DRORI, R.; ABELES, M. Motor cortical activity related to movement kinematics exhibits local spatial organization. **Cortex**, v.45, n.3, p.418-31, mar 2009.

STRATA. J. *et al.* Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization - implications for a rodent model of cerebral palsy. **Neuroscience**, v.129, n.1, p.141-56, 2004.

SZABO K.T. Sensory system. In: Congenital malformations in laboratory and farm animals. 1st ed. Szabo K.T. (ed). **Academic Press**, pp 245-268, apr. 1989.

TALMADGE, R.J.; Roy, R.R. Eletrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. **J Appl Physiol**, v.75, n.5, p.:2337-2340, nov 1993.

TANG, W.W.; JOVEM, M.P.; MAMIDI, A. *et al.* A Mouse Model of Zika Virus Sexual Transmission and Vaginal Viral replication. **Cell Rep**, v.17, n.12. p.: 3091-3098, dec 2016.

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

TOSCANO, A.E.; FERRAZ, K.M.; MANHÃES-DE-CASTRO, R. *et al.* Passive stiffness of rat skeletal muscle undernourished during fetal development. **Clinics**, v.12, n.65, p.:1363-9, 2010.

TSUTSUMI, O.; CRUZ, V. S.; CHIARELLO, B.; *et al.* Os Benefícios da Natação Adaptada em Indivíduos com Lesões Neurológicas. Santo André. **Revista Neurociências**, v.12, n.2, p. 24, abr/jun 2004.

UENO, M.; KATAYAMA, K.; NAKAYAMA, H. *et al.* Mechanisms of 5-azacytidine (5Az-C)-induced toxicity in the rat brain. *Int. J. Exp. Path.* v.83, n.3, p.139-150, jun 2002a.

VAN PRAAG, H.; KEMPERMANN, G.; GAGE, F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. **Nat Neurosci**, v.2, n.3, p.266-70, mar 1999.

VASCONCELOS, R.G.; MOURA-MATTARAIA, V.G.M.; NOGUEIRA, M.I. *et al.* Efeitos pré-natais da sertralina sobre o desenvolvimento e crescimento somáticos de ratos neonatos. **RESBCAL**, v.1 n.1, p. 41-53, mar. 2012.

VASSAL, G.; DEROUSSANT, A.; HARTMANM, O. *et al.* Dose-dependent neurotoxicity of high-dose busulfan in children: A clinical and pharmacological study. **Cancer Res.** v,50, n.19, p.: 6203–6207, oct1990.

VERSCHUREN, O.; KETELAAR, M.; TAKKEN, T. *et al.* Exercise programs for children with cerebral palsy: a systematic review of the literature. **Phys Med Rehabil.** v. 87, n. 5, p. 404-417, May. 2008.

VENTURA, C.V., MAIA, M.; VENTURA, B.V. *et al.* Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. **Arq Bras Oftalmol.** v.79, n.1, p.:1-3, fev 2016.

VILLAR, J.; CHEIKH ISMAEL, L. VICTORIA, C.G. *et al.* International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21st Project. **Lanceta.** v.384, n.9946, p.: 857-68, set 2014.

WAITE, L.M.; GRAYSON, D.A.; PIGUET, O. *et al.* Gait slowing as a predictor of incident dementia: 6-year longitudinal data from the Sydney Older Persons Study. **J Neurol Sci**, v.15, n.229, p.89-93, mar 2005.

WEN, Z.; SONG, H.; MING, G. How does Zika virus cause microcephaly?. **GENES & DEVELOPMENT**, v.31, p.849–861, dec,2018.

WEST-EBERHARD M.J. Developmental plasticity and evolution: **Oxford University Press**; 2003.

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

WINTER, D.A. Human balance and posture control during standing and walking. **Gait Posture**. v.3, p.:193- 214, dec 1995.

WADDINGTON CH. O epigenótipo. **Empenho**, v.81, p.18–20, 1942.

WIGSTON, D.J. ENGLISH, A.W. Fiber-type proportions in mammalian solues muscle during postnatal development. **J.Neurobiol**, v.23, n.1,p.61-70,1992.

WOODS, C.G. Microcefalia humana. **Curr Opin Neurobiol** v.14, p. 112–117, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Management of substance abuse. Alcohol [Internet]. 2008 [cited 2008 Mar 9]. Available from: http://www.who.int/substance_abuse/facts/alcohol/en/index.html.

YEARGIN-ALLSOPP, M., BRAUN K,V.N., DOERNBERG N.S., BENEDICT,R.E., KIRBY,R.S., DURKIN,M.S. **Pediatrics**. v.121, n.3, p.547-54, mar 2008.

ZOMPI, S. HARRIS, E. Modelos animais de infecção pelo vírus da dengue. **Vírus**, v.4, n.1, p: 62-82, jan 2012.

ZORZI, V.; MINATO SAGRILLO, L.; RECHIA FIGHERA, M. *et al.* Treinamento de natação protege do desequilíbrio em ratos expostos à vincristina [en línea]. 11º Congreso Argentino de Educación Física y Ciencias, 28 de septiembre al 2 octubre de 2015.

APÊNDICE A - EXPERIMENTAL MODEL OF MICROCEPHALY ASSOCIATED WITH CONGENITAL SYNDROMES: CRITERIA FOR EVALUATION OF DAMAGE IN SOMATIC GROWTH, PHYSICAL FEATURES AND REFLEX MATURATION

Henrique Gouveia^a, Raul Manhães-de-Castro^b, Bárbara Juacy Rodrigues Costa de Santana^c, Carolina Ramos de Mendonça^a, Tássia Karin Borba^c, Sabrina da Conceição Pereira^d, Raquel da Silva Aragão^e, Ana Elisa Toscano^{f,*}

^aPost Graduate Program in Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^bDepartment of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^cPost Graduate Program in Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^dPost Graduate Program in Physical Therapy, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^eDepartment of Physical Education and Sports Science, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

^fDepartment of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

*Corresponding author at: Department of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, 55608-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil. E-mail: aeltoscano@yahoo.com.br

Abstract

Microcephaly is characterized by abnormal growth of the skull and its diagnostic criterion is performed by the frontal-occipital circumference of the child. Recently, there has been an outbreak of microcephaly in children in the Americas. There are no studies on diagnostic criteria for microcephaly in animal models. In this study, we investigated diagnostic criteria composed by somatic growth, physical features and reflex ontogeny in rats submitted to an experimental model of microcephaly. For this, female rats received Busulfan (group B) (10 mg / kg / 0.5 ml / 100 g body weight) or olive oil (group C) (0.5 ml / 100 g body weight) intraperitoneally on days 12, 13, 14 of gestation (initial period of development of the cortex). In the offspring of these females, the cranial measurements, physical features and maturation of reflexes from post-natal day 1(P1) to P21 were evaluated. All measures of somatic growth of group B animals were smaller than group C in P1. There was a delay in the eruption of the upper and lower incisors and the palmar grasp and righting reflexes of pups from group B compared to group C. These data reinforce the need to establish criteria not only morphological but also functional in the diagnosis of microcephaly in animal models.

Keywords: Somatic Growth; Reflex Ontogeny; Physical Features; Rat; Microcephaly.

1. Introduction

Microcephaly in humans and in several mammal species results from brain growth deficits during gestation (primary microcephaly) or later after birth (secondary microcephaly) (Woods Parker, 2013). The causes are genetic or environmental and

occur when the brain does not develop properly or there is an interruption of its development (Abuelo, 2007). In humans, according to the World Health Organization (WHO), the epidemiological criterion for diagnosis of microcephaly is the measurement of the frontal-occipital cranial circumference during the first week of life (WHO, 2014). Values of this circumference less than -2 standard deviations below the mean specific for sex and gestational age confirm the diagnosis (WHO, 2014). Children with microcephaly associated with congenital syndromes may present with mental retardation, cerebral palsy, epilepsy, irritability, ocular disorders and persistence of primitive reflexes (Aragao *et al.*, 2016, Oliveira *et al.*, 2016; Van der Linden *et al.* *al.*, 2016, Ashwal *et al.*, 2009). However, children without the presence of microcephaly may also have consequences related to teratogenic agents (França *et al.*, 2016; Van der Linden *et al.*, 2016). For this reason, Brazil (2017) recommends the inclusion of new criteria, such as loss of vision, hearing and limb impairment to diagnose the damage caused by teratogenic agents (Brazil, 2017a).

In animals as well as in humans, it is possible to evaluate non-invasively the presence of damage from the murinometric / anthropometric measures, somatic growth and the reflex ontogeny (Van der Linden *et al.*, 2016; Smart and Dobbing, 1971; Fox, 1965). Somatic growth and physical features maturation allow the diagnosis of microcephaly and other physical abnormalities, while reflex ontogeny is considered an indicator of the development and maturation of the central nervous system (Smart and Dobbing, 1971; Fox, 1965).

There are no studies in the literature that demonstrate the diagnostic criteria or the validation of criteria for microcephaly in rats, as well as on other damages observed when there is no change in the circumference of the head. Thus, the present study aims to determine noninvasive criteria to evaluate the presence of

damage in an experimental model of microcephaly associated with congenital syndromes in Wistar rats. It is known that anti-cancer treatment with Busulfan in human pregnant women led to microcephaly in children (Bishop; Wassom, 1986). In rats, the gestational administration of Busulfan caused microcephaly and microphthalmia in the offspring (Furukawa *et al.*, 2007). At the present work, the teratogenic agent Busulfan was used during gestation for the possible induction of the cephalic perimeter alteration or other damages in pups development. Diagnostic criteria were composed by somatic growth, physical features and reflex ontogenesis. The parameters were evaluated from Post-natal day 1 (P1) to Post-natal day 21 (P21).

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Fifteen female Wistar albino rats (220-250g) and 8 male Wistar rats (320-390g) were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco. They were housed (2 females for 1 male). The day of conception was considered the day the spermatozoa were identified on the vaginal smear. The pregnant rats were randomly divided into two groups, based on the pharmacological induction of microcephaly: Control (C, n = 7) and Busulfan (B, n = 8). Group B received Busulfan (sigma, 10 mg / kg / 0.5 ml / 100 g rat body weight), diluted in olive oil intraperitoneally (i.p.). The dose of 10 mg / kg was previously reported to be effective in inducing microcephaly (Furukawa *et al.*, 2007). Group C received olive oil (0.5 ml / 100 g rat body weight, i.p.). The rats were submitted to pharmacological manipulation on Gestational Day 12, 13 and 14, initial phase of development of the cerebral cortex (Furukawa *et al.*, 2007; Desesso, 2005).

After birth, there was no reduction of litters to the standard of 8 pups per mother, since the criterion used to reduce litter (body weight between 6 and 8 g) could exclude animals with developmental damage (Bento-Santos *et al.*, 2011). The pups remained with their respective mothers until P21. After weaning, the animals were kept in number of 3-4 animals per cage. All animals were kept at 22 ± 2 ° C, inverted light-reverse cycle of 12/12 hours (light 20:00 - 08:00) with food and water were offered *ad libidum*. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee in Animal Experimentation from Federal University of Pernambuco (protocol 0040/2016) These experimental procedures followed the Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals of the National Council for the Control of Animal Experimentation.

2.2 Reproducibility criteria

Experiments were performed to evaluate the somatic growth, physical features and maturation of the nervous system. The pups were evaluated daily from P1 to P21 to establish the diagnostic criteria for microcephaly.

To assess somatic growth, pups from both groups were evaluated daily between 10.00 and 12.00am with a digital caliper (Starrett, accuracy 0.01 mm) (Silva *et al.*, 2006). Distances (mm) between the muzzle and the external occipital protrusion of the skull (Anteroposterior axis of head - APAH), between the orifices of the ears (Lateral skull axis-LSA), between the muzzle and the anus (Longitudinal axis-LA) and between the base and the tail end of the animal (Tail length-TL) were evaluated (Silva *et al.*, 2006).

Physical features were evaluated daily between 08.00 and 10.00am. The day when each physical feature was first observed was considered as the age at maturation. In the pups were evaluated ear unfolding, opening of the auditory canal and eyes opening, as well as the day in which the upper incisors and lower incisors ruptured the gums and are exposed (Smart; Dobbing, 1971).

Reflex ontogeny was evaluated as described by Smart and Dobbing (1971) and Fox (1965). Responses were evaluated daily (between 08.00 and 10.00am) until maturation. The first of a series of three consecutive days in which the expected response appeared completely was considered the day of maturation of the reflex. The observed responses that indicated reflex maturation were: animal does not do the rapid flexion of the fingers after two slight percussions in the forepaw palm (Palm grasp reflex); the animal rotate the body in dorsal decubitus for ventral decubitus within 10 seconds (Righting reflex); animal put forepaws on the table, trying to walk when suspended by the tail in up to 10 seconds (Vibrissa placing reflex); angular displacement of 45° of the animal in up to 10 seconds , when the animal is placed with the forepaws on the margin of a flat and high surface (precipice) (Cliff avoidance reflex); the simultaneous and rapid retraction with involuntary immobilization of the animal's body after acute stamping (Auditory Startle reflex); when held by all four paws in dorsal decubitus and let to fall a 30 cm height, the animal full turn the body leaning on all four legs in a cotton bed (Free-fall righting reflex); in the center of a 45° incline ramp, positioned with the head downwards, the animal rotates within 10 seconds and positions the head upwards (Negative geotaxis reflex).

At P1, a first classification of the animals in Group B regarding the presence of microcephaly was performed using the values of both axes of skull (APAH and LSA) compared to those from group C. Animals from group B that presented, at least, one

of the two axes that measured below the value of the group C mean minus one standard deviation were classified as microcephaly. From P1 to P21 the pups of both Control and Busulfan groups are also analyzed for physical features and reflex ontogenesis.

After classification of the animals in microcephalic or not, the animals of group B that did not present microcephaly were submitted to a second classification as minor (<) or greater (>) for the presence of damages, that is, in relation to the delay in the maturation of the physical features or ontogeny of reflexes. The cut-off point used was the median of group C. Thus, for an animal to present some damage, it should present the greatest maturation day (>) when they were in group C. For this second classification the animals were evaluated from P1 to P21.

2.3 Statistical analyses

Data analysis was performed using the statistical program GraphPad Prism 7. Normality was assessed using the Kolmogorov-Smirnov test. A Student T-test was performed for somatic growth and data are expressed as means $\pm$ SD. A Mann Whitney test was performed for physical features maturation and reflex ontogeny and data are presented as median and minimal and maximal values. Statistical significance was defined as $P < 0.05$ in all cases.

3. Results

3.1. Classification of the pups in microcephalics or not

After the first classification of the pups, it was observed that all measures of somatic growth of the animals of group B were smaller ($p < 0.0001$) than group C in

P1. The presence of microcephaly was observed in 56 (94,92%) animals of group B. Only 3 (5,08%) animals were not classified as microcephalic.

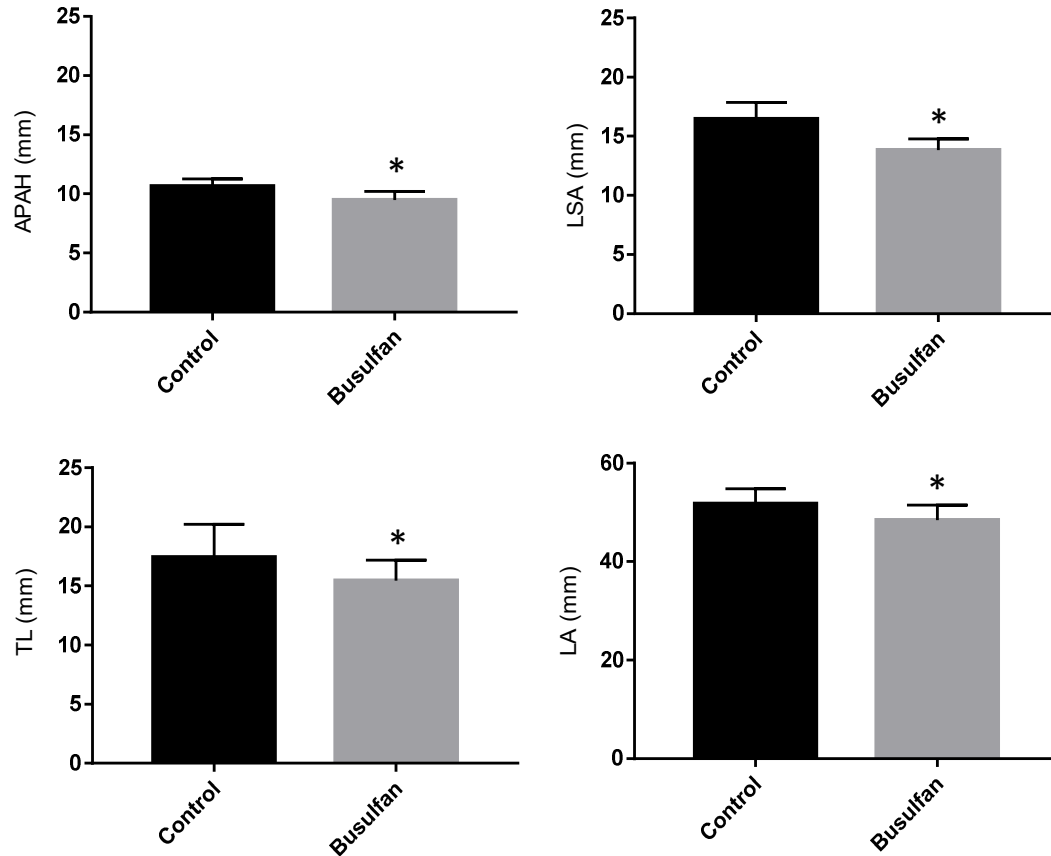


Figure 1. Anteroposterior axis of head (APA), Lateral skull axis (LSA), Tail length (TL) and Longitudinal axis (LA) of offspring from Control (n=35) and Busulfan groups (n=56) at P1. Data were expressed as mean $\pm$ SD. Values are presented as means $\pm$ standard deviation. Student T-test. *versus Control (p<0.0001).

Regarding physical features maturation, eruptions of the upper and lower incisors of pups from group Busulfan were delayed compared to the Control group (p<0.05). Palmar grasp and righting reflexes maturation were also delay in pups from Busulfan group compared to Control group (p <0.05) (Table 1).

Table 1. Physical features and reflex ontogeny of offspring from Control and Busulfan groups

	Control (n=35)		Busulfan (n=56)	
	Median	Maximum-Minimum	Median	Maximum-Minimum
Physical features				
Ear unfolding	3 (35)	2-8	4 (56)	3-8
Auditory conduit opening	14 (35)	11-16	13 (56)	13-14
Upper incisors eruption	11 (35)	9-5	11 (56)	10-15*
Lower incisors eruption	10 (35)	8-12	11 (56)	7-15*
Eyes opening	15 (35)	12-16	15 (56)	13-18
Reflex-ontogeny				
Palmar grasp	6 (35)	4-9	7 (56)	4-13*
Righting	4 (35)	2-8	5 (56)	2-8*
Vibrissa placing	8 (35)	4-12	8 (56)	2-11
Clip avoidance	7 (35)	3-14	7,5 (56)	3-13
Auditory startle	14 (35)	12-16	13 (56)	13-14
Free-fall righting	14 (35)	14-17	14 (56)	13-17
Negative geotaxis	15 (35)	13-18	15 (56)	10-17

*P<0.05 versus Control. Mann Whitney test.

3.3. Evaluation of the presence of damage in non-microcephalic animals

In the second classification, of the animals that received busulfan and did not present microcephaly. Animals that were not classified as microcephalic showed a delay ($p<0.05$) in the physical features of eruption of the upper and lower incisors and eyes opening. There was also delay ($p<0.05$) in the reflexes of righting, vibrissa placing, free-fall righting and negative geotaxis (Table 2).

3.4. Parameters selected for evaluation of the presence of damage after gestational administration of Busulfan

The pups of group B with microcephaly presented delayed eruption of the lower and upper incisors, and delayed maturation of palm grasp and righting reflexes. Pups of group B without microcephaly presented delayed eruption of the lower and

upper incisors and eyes opening as well as delayed maturation of vibrissa placing, free-fall righting and negative geotaxis. Thus, these parameters were selected to evaluate the presence of developmental impairment in microcephalic or non-microcephalic animals (Table 2).

Table 2. Criteria for evaluation of damage in physical features and reflex maturation

Presence of damage in non-microcephalic animals							
	UIE	LIE	EO	R	VP	FFR	NG
Animal 1	✓	✓		✓	✓	✓	✓
Animal 2		✓			✓	✓	✓
Animal 3		✓	✓	✓		✓	✓

Parameters selected for damage assessment after gestational administration of Busulfan	
Physical features	Reflex-ontogeny
Upper incisors eruption	Palmar grasp
Lower incisors eruption	Righting
Eyes opening	Vibrissa placing
	Free-fall righting
	Negative geotaxis

Upper incisors eruption (UIE), Lower incisors eruption (LIE), Eyes opening (EO), Righting (R), Vibrissa placing (VP), Free-fall righting (FFR), Negative geotaxis (NG). “✓” Means delay ($p < 0.05$) in maturation of physical features or reflex ontogeny in the Busulfan group when compared to Control group after second classification.

4. Discussion

In the present study, we evaluated the offspring of rats that were submitted to a pharmacological agent inducing microcephaly with the purpose of validating a diagnostic criterion of damages in animals with or without the presence of microcephaly. It was evaluated a set of parameters, such as somatic growth, physical features and ontogenesis of reflexes during the first 21 days of age, in order to observe possible changes in somatic growth and maturation of the nervous system.

Among the measures of somatic growth, we emphasize the reduction in APAH and LSA. These characteristics are indicative of reduction of the fronto-occipital cranial circumference, considered the criterion for the diagnosis of microcephaly in humans (WHO, 2014). The reduction of the frontal-occipital cranial circumference is an indication of malformations in the encephalon, where reduction of the encephalic mass, hypoplasia of cortical areas and corpus callosum, as well as disproportionalities between the brain areas are frequent (Huang *et al.*, 2016b; Barchovich Peacock, 1998). These brain changes have been observed in microcephalic patients and are associated with underdevelopment of cognitive functions, with reduction of intelligence quotient indexes (Dorman, 1991). In addition, motor disorders such as dysphagia, apraxia, spasmodic movements and generalized seizures are observed (Leal *et al.*, 2007; Kortüm *et al.*, 2009). While the great majority of offspring whose mothers were treated with Bulsufan presented reduction in cranial axis, it is worth mentioning that 3 rats of the studied population did not present those axes receiving the diagnosis of non-microcephalic but with the presence of damages. This observation refers to cases in humans, that although the brain presents microcephalic formations, the dimensions of the head are above the limit value determined (Van der Linden *et al.*, 2016). Thus, apparently healthy, these individuals present cognitive and motor deficiencies similar to individuals with microcephaly (Van der Linden *et al.*, 2016). Similarly, in our study, rats that showed no reduction APAH or LSA, presented parameters indicative of somatic underdevelopment and immaturity of the central nervous system (CNS).

Since the reduction of the fronto-occipital cranial circumference indicates brain malformations and motor disorders, it is not surprising the delay in the loss of palmar grasp (PG) and the appearance of Righting in the animals. The reflex ontogenesis

involves a simultaneous sequence of events and the participation of various regions of the CNS and is considered an indicator of its development and maturation (Smart; Dobbing, 1971; Fox, 1965). The palmar hold reflex is classified as primitive, innate, and disappears as soon as the CNS matures (Adlard; Dobbing, 1971). Thus, the delay in the disappearance of this reflex in rats from Busulfan group may suggest underdevelopment or CNS damage. The PG reflex is mediated by spinal cord motoneurons (Futagi *et al.*, 2012), leading us to suggest that lesions in this structure may result in the delay in the disappearance of the PG reflex. The Free-fall righting (FFR) reflex and Righting(R) reflexes require limb coordination and balance and are acquired with CNS maturation (Cassydi *et al.*, 1994). Such reflexes involve several structures of the CNS, among them, the cerebellum and also the spinal cord (Cassydi *et al.*, 1994). In microcephaly, the disproportion between brain structures is evident, and the incidence of individuals with disproportionately small cerebellum is high (Barchovich and Peacock, 1998). The delay in the onset of R and FFR reflexes suggests that microcephalic or non-microcephalic animals may have a disproportionately small cerebellum as documented in humans. The negative geotaxis reflex is used for the diagnosis of vestibular and/or proprioceptive function (Motz and Alberts, 2005). Considering the above, the reflexes cited as criteria for evaluation of damage include innate reflexes, such as PG, and acquired, such as FFR and R, which provides an excellent indication of the development and maturation of the CNS, since they involve different areas of the CNS.

The delay in the physical characteristics of UIE and LIE were the most relevant changes in the group Busulfan pups. This parameter depends on a sequence of events, which includes movement of the tooth from the alveolar bone into the oral cavity, associated with osteoclastic activity with bone resorption (Wise *et*

et al., 2008). The development of the mandible can directly influence the eruption of the incisors and the delay in eruption may be related to craniofacial changes present in the microcephalic. In fact, changes in the mandible are common in individuals who have abnormalities in the skull (Huang *et al.*, 2016a). This can occur especially with microcephaly, where craniofacial alterations also affect the mandible, reflecting malformations such as dysostosis (Huang *et al.*, 2016a) and reduction of mandibular opening (Leal *et al.*, 2017). Although the mandible morphology in our study has not been evaluated, we do not rule out the possibility that the delay in the eruption results from malformations in the mandible. The eruption of the incisors may also indicate craniofacial malformations. Câmara *et al.* (1992) demonstrated that the occurrence of a single incisor in the maxilla may be associated with the occurrence of microcephaly and holoprosencephaly (Cámara *et al.*, 1992). The authors suggest a close relationship between maxillary development and eruption of teeth with cranial changes, such as microcephaly (Cámara *et al.*, 1992). The animals of the present study also presented delayed ocular opening. Ocular changes are observed in the presence of microcephaly. Children with microcephaly tend to have optic nerve abnormalities and macular lesions (De Paula Freitas *et al.*, 2016).

In general, we observed that in a single litter whose mother received Busulfan during pregnancy, not all rats were diagnosed with microcephaly. In this population, 94,92% of the rats presented microcephaly. In control litters, all subjects were classified as non-microcephalic. This difference between individuals of the same litter is already expected, especially when microcephaly is the consequence of a teratogenic agent. The pups development during gestation and after birth may be influenced by sibling numbers and maternal physiology (Haig, 1993; Vom-Saal, 1989). The competition for limited resources is considered to be one of the main

mechanisms responsible for shaping the differences between pups of the same litter (Haig, 1993; Vom-Saal, 1989). In addition, the recent episode of numerous cases of microcephaly of teratogenic origin due to infection with Zika virus revealed that in a twin pregnancy it is possible that microcephaly is present in only one fetus (Brazil, 2017b).

5. Conclusion

The diagnostic criteria of somatic growth, physical features and reflex ontogenesis are relevant for the evaluation of microcephalic rats or not. Changes in these parameters are similar to those observed in humans. We emphasize that the parameters included in the diagnostic criteria belong to different developmental indicators, allowing the evaluation of both somatic growth and CNS maturation. Therefore, the diagnostic criteria proposed in this study ensures a more comprehensive evaluation of the development, considering not only anatomical and macroscopic characteristics, but also functional characteristics. This method can be used to diagnose microcephaly and damage without the presence of microcephaly in rats in several experimental microcephaly models.

6. Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

7. References

ABUELO, D. Microcephalysyndromes. *SeminPediatrNeurol*, v. 14, n. 3, p. 118-27, 2007. DOI: 10.1016/j.spen.2007.07.003

ADLARD, B. P.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. 3. Development of four enzymes in the brains of normal and undernourished rats. *Brain Res*, v. 28, n. 1, p. 97-107, 1971. DOI: 10.1016/0006-8993(71)90527-0

ARAGAO, M. D. F. V.; VAN DER LINDEN, V.; BRAINER-LIMA, A. M., *et al.*^{[1][SEP]} Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *BMJ*, v. 353, i1901, 2016. DOI: 10.1136/bmj.i1901

ASHWAL, S. *et al.* Practice parameter: Evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology*, v. 73, n. 11, p. 887-97, 2009. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3181b783f7

BARKOVICH, A. J.; PEACOCK, W. Sublobar dysplasia: a new malformation of cortical development. *Neurology*, v. 50, n. 5, p. 1383-7, 1998. DOI: 10.1101/cshperspect.a022392

BENTO-SANTOS, A. *et al.* Critérios para escolha da amostra em experimentos com ratos Wistar. *Resbcal*, v. 1, n. 1, p. 121-129, 2012.

BISHOP, J. B.; WASSOM, J. S. Toxicological review of busulfan (Myleran). *Mutat Res*, v. 168, n.1, p. 15-45, 1986. DOI: 10.1016/0165-1110(86)90020-5

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

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

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

CASSIDY, G.*et al.* The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. *Brain Behav Evol*, v. 43, n. 4-5, p. 244-53, 1994.
 DOI: 10.1159/000113638

DE PAULA FREITAS, B. *et al.*Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed ZikaVirus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol*, 2016. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2016.0267

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

DORMAN, C. Microcephaly and intelligence. Dev Med Child Neurol, v. 33, n. 3, p. 267-9, 1991. DOI: 10.1111/j.1469-8749.1991.tb05118.x

FOX, W. M. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. Anim Behav, v. 13, n. 2, p. 234-41, 1965. DOI: 10.1016/0003-3472(65)90041-2

FRANÇA, G. V. *et al.* Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. Lancet, v. 388, n. 10047, p. 891-7, 2016. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30902-3

FURUKAWA, S. *et al.* Microencephaly and microphthalmia in rat fetuses by busulfan. Histol Histopathol, v. 22, n. 4, p. 389-97, 2007. DOI: 10.14670/HH-22.389

FUTAGI, Y.; TORIBE, Y.; SUZUKI, Y. The grasp reflex and moro reflex in infants: hierarchy of primitive reflex responses. Int J Pediatr, v. 2012, p. 191562, 2012. DOI: 10.1155/2012/191562

HAIG, D. Genetic conflicts in human pregnancy. Q. Rev. Biol., v. 68, n. 4, p. 495-532, 1993. DOI: 10.1086/418300

HUANG, L. *et al.* Mandibulofacial Dysostosis with Microcephaly: Mutation and Database Update. *Hum Mutat*, v. 37, n. 2, p. 148-54, 2016a. DOI: 10.1002/humu.22924

HUANG, W. C. *et al.* Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. *Sci Rep*, v. 6, p. 34793, 2016b. DOI: 10.1038/srep34793

KORTUM, F. *et al.* The core FOXP1 syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis. *J Med Genet*, v. 48, n. 6, p. 396-406, 2011. DOI: 10.1136/jmg.2010.087528

LEAL, M. C. *et al.* Characteristics of Dysphagia in Infants with Microcephaly Caused by Congenital Zika Virus Infection, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis*, v. 23, n. 8, p. 1253-1259, 2017. DOI: 10.3201/eid2308.170354

MOTZ, B. A.; ALBERTS, J. R. The validity and utility of geotaxis in young rodents. *Neurotoxicol. Teratol*, v. 27, n. 4, p. 529-33, 2005. DOI: 10.1016/j.ntt.2005.06.005

OLIVEIRA, C. S.; VASCONCELOS, P. F. C. Microcefalia e vírus zika. *J. Pediatr*, v. 92, n. 2, 2016. DOI: 10.1016/j.jpmed.2016.02.003

SILVA, H. J. *et al.* Malnutrition and Somatic Development: Application of Protocol of Mensuration to Evaluation of Indicators of Wistar Rats. *Int. J. Morphol.*, v. 24, n. 3, p. 469-474, 2006. DOI: 10.4067/S0717-95022006000400028

SMART, J. L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res*, v. 28, n. 1, p. 85-95, 1971. DOI: 10.1016/0006-8993(71)90526-9

VAN DER LINDEN, V. *et al.* Description of 13 Infants Born During October 2015-January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth - Brazil. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 65, n. 47, p. 1343-1348, 2016. DOI: 10.15585/mmwr.mm6547e2

VOM-SAAL, F. S. Sexual differentiation in litter-bearing mammals: influence of sex of adjacent fetuses in utero. *J. Anim. Sci.*, v. 67, n. 7, p. 1824-40, 1989. DOI: 10.2527/jas1989.6771824x

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

WISE, G. E.; KING, G. J. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res*, v. 87, n. 5, p. 414-34, 2008. DOI: 10.1177/154405910808700509

WOODS, C. G.; PARKER, A. Investigating microcephaly. *Arch. Dis. Child*. v. 98, n. 9, p. 707-13, 2013. DOI: 10.1136/archdischild-2012-302882

APÊNDICE B - OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O MESTRADO (ARTIGO PUBLICADO 1)

Review

Oro-facial functions in experimental models of cerebral palsy: a systematic review

D. C. LACERDA*, K. N. FERRAZ-PEREIRA[†], A. T. BEZERRA DE MORAIS[‡], B. J. R. COSTA-DE-SANTANA[§], O. G. QUEVEDO[¶], R. MANHÃES-DE-CASTRO** & A. E. TOSCANO^{††}
^{*}Post Graduate Program in Nutrition, Federal University of Pernambuco UFPE, Recife, PE, [†]Department of Physical Education and Sports Science, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, [‡]Post Graduate Program in Physical Therapy, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, [§]Post Graduate Program in Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Federal University of Pernambuco UFPE, Recife, PE, Brazil, [¶]Facultad de Químico-Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, Mexico, ^{**}Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, and ^{††}Department of Planning, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil

SUMMARY Children who suffer from cerebral palsy (CP) often present comorbidities in the form of oro-facial dysfunctions. Studies in animals have contributed to elaborate potential therapies aimed at minimising the chronic disability of the syndrome. To systematically review the scientific literature regarding the possible effects that experimental models of CP can have on oro-facial functions. Two independent authors conducted a systematic review in the electronic databases Medline, Scopus, CINAHL, Web of Science and Lilacs, using Mesh and DeCS terms in animal models. The motor and sensory parameters of sucking, chewing and swallowing were considered as primary outcomes; reactivity, odour, controlled salivation, postural control, head mobility during feeding and the animal's ability to acquire food were secondary outcomes. Ten studies were included in the present review. Most studies used

rabbits as experimental models of CP, which was induced by either hypoxia-ischemia, inflammation or intraventricular haemorrhage. Oro-facial functions were altered in all experimental models of CP. However, we found more modifications in hypoxia-ischemia models overall. On the other hand, the model of inflammation was more effective to reproduce higher damage for coordinating sucking and swallowing. All of the CP experimental models that were assessed modified the oral functions in different animal species. However, further studies should be conducted in order to clarify the mechanisms underlying oro-facial damage in order to optimise treatment strategies for children who suffer from CP.

KEYWORDS: animal models, cerebral palsy, feeding behaviour, sucking, chewing, swallowing

Accepted for publication 31 January 2017

Background

Cerebral palsy (CP) is described as a neurological syndrome characterised by changes in movement, posture and muscle tone, resulting in non-progressive lesions that occur in foetal central nervous system or during child development (1). This syndrome causes functional dependency and limitations for the

performance of daily activities in children (2). The insult can either occur during pregnancy, at birth or in early life (3), having a prevalence of two to 3.5 cases per 1000 live births (4, 5). Most cases of CP (70–80%) are caused by problems during the perinatal period, followed by central nervous system infections during the post-natal period and complications during labour, such as neonatal asphyxia (6, 7).

Children with CP usually also present comorbidities, including drooling, sucking, chewing and swallowing, which are referred to as oro-facial dysfunctions (8–10). These dysfunctions result in feeding difficulties and a poor nutritional state (11, 12). It is estimated that 85% of children with CP have feeding difficulties (13), 65% have masticatory movement deficits, and 40% have saliva control dysfunction (14).

These feeding difficulties increase the risk of mortality and are associated with poor prognosis of the syndrome (15). The most common causes of death in children with CP that are secondary to respiratory disorders and oro-facial dysfunctions and are therefore important to highlight (16). In underdeveloped countries, most children with CP have feeding difficulties, which lead to moderate or severe malnutrition (17, 18). Several reports state that malnutrition is the leading cause of death in children with CP in some underdeveloped countries, as in the Indian Subcontinent (19).

The impairments in oro-facial functions damage the child's ability to safely consume the calories and nutrients needed for growth (12). In addition, abnormalities in anatomical structures involved with the oral preparation and with the development of the swallowing reflex can result in severe feeding dysfunction and inadequate food intake (12, 20). Furthermore, these abnormalities limit food intake due to the lack of control of salivation, coughing episodes, incoordination of mandibular muscles, poor control of tongue, and delayed swallowing, resulting in an extended mealtime and frustration of both the child and parents (21, 22).

CP is considered the most common cause of disability during childhood (23), and studies in animals have provided important advances and great knowledge of the pathogenesis of this syndrome (24). Such studies have contributed to elaborating potential therapies aimed at minimising the chronic disability of the syndrome (25). Experimental models replicate one or more of the main features of CP in animals. However, there is significant heterogeneity in these models. The variability in the experimental models arises from different aspects of the syndrome, such as time, the mechanism, the extent of injury, the use of different species and outcome parameters.

Most of the studies that use experimental models of CP investigate the mechanisms underlying

neurological findings and changes in locomotor activity. However, studies in the literature about the mechanisms related to feeding behaviour and oro-facial functions of these animals are scarce. Therefore, the impact of experimental models of CP in oro-facial functions and the evaluation of derived impairments and mechanisms associated with these events are important to assess. Given the above, the objective of this study was to produce a systematic review that shows the possible effects induced by experimental models of CP on the oro-facial functions and investigate the mechanisms associated with these effects. Thus, we addressed the following focused question: 'Do animals submitted to an experimental model of CP develop oro-facial alterations that are different from animals that are not exposed to any model?'

Methods

This systematic review complies with Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) (26). In addition, the protocol of this systematic review was published in the Collaborative Approach to Meta-Analysis and Review of Animal Data from Experimental Studies (CAMARADES) (Registration number: SC005336).

Search strategy

The literature search was conducted in April 2015 in the electronic databases Medline/PubMed (National Library of Medicine/Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), SCOPUS, CINAHL, LILACS (Latin American and Caribbean Health Sciences) and Web of Science. The research focused on experimental studies using experimental models of CP in animals where oro-facial functions were evaluated. The following MeSH terms or DECS descriptors were included in the search: 'Animals', 'Models', 'Animal Models', 'Rats', 'Rabbits', 'Sheep', 'Cats', 'Primates', 'Piglets', 'Cerebral Palsy', 'mouth', 'Behavior', 'Feeding Behavior', 'Smell', 'Mastication', 'Sucking Behavior', 'deglutition', 'Olfaction disorders', 'Salivation' and 'Taste'. There was no restriction on the year of publication nor of the language. In addition, only experimental studies using animals were selected.

The literature research was conducted in electronic databases by two independent reviewers

(Lacerda DC and Terácius A) based on a pre-defined protocol. A third reviewer (Fernaz-Pereira KN) was consulted when needed as a mediator for the definition of inclusion or exclusion of items when there was no agreement between reviewers. Finally, the extraction of the data was performed according to the assessment of the eligibility criteria defined in the study.

Inclusion criteria

To select the articles presented in this systematic review, the following inclusion criteria were established: (i) experimental models that used animals; (ii) CP induction in animals during gestation or the first days of life; (iii) experimental articles that presented a control group in their study design; and (iv) articles that evaluated parameters of oro-facial functions.

Exclusion criteria

The articles were excluded if they did not describe in detail the CP induction method, which would prevent replication of the model.

Assessment of articles

The methodological assessment of the studies and the risk of bias were carried out to avoid specific issues that could interfere with the internal validity of the experimental studies, according to the points highlighted by Hooijmans *et al.* (27): accommodation, lighting, temperature, water, diet and code of ethics. In the analysis of sample features, induction protocol of CP and evaluation of outcomes were considered, as well as animal species, CP model used, induction period and age of the evaluation of oro-facial function parameters. Primary outcomes were motor and sensory parameters of the oro-facial functions of sucking, chewing and swallowing. Secondary outcomes were odour sensitivity, postural control and mobility of the head during feeding, ability of the animal to acquire food and control salivation. The level of agreement between reviewers evaluating studies for data extraction and assessments study quality (risk of bias) was assessed by Kappa Statistics using Statistical Package for the Social Sciences – SPSS version 20 for Windows (IBM SPSS Software, Armonk, NY, USA).

Results

Initial research in databases performed by two reviewers showed 1174 articles in Medline/PubMed, 452 articles in Scopus, 341 articles in CINAHL, seven articles in Lilacs and 596 articles in Web of Science. After analysing the titles and abstracts of all 2570 articles found, 2530 articles were excluded because they did not include outcomes set out in the inclusion criteria and/or met the exclusion criteria. After thorough evaluation of the 40 included, 15 were duplicates and 15 did not meet the criteria for inclusion and/or met the exclusion criteria after reading the full text. Therefore, a total of 10 articles were included in this review, as shown in Fig. 1.

Table 1 shows the evaluation of the articles according to the points highlighted by Hooijmans *et al.* After evaluation of the quality criteria, we observed that all studies had methodological deficits. Of the 10 articles included, only five studies met 60% (28–32) of the criteria analysed. The level of agreement among reviewers for data extraction and bias risk analysis was high (Kappa: 0.783).

Sample characteristics and parameters evaluated in this review were summarised according to the model of CP in Tables 2–4. Three studies used inflammation as a CP model (Table 2), two studies, intraventricular haemorrhage (Table 3), and five, hypoxaemia (Table 4). Of these articles, besides the variability in the model of induction of cerebral palsy used, the heterogeneity of the included studies was also verified in the species of the animals, the CP induction period and in the evaluated parameters. Given the variety of the models, the results are presented according to the findings of each induction model.

Of the three articles that induced inflammation to establish CP, two underwent lipopolysaccharide (LPS) administration in rabbits during pregnancy (8th day of pregnancy). Whereas one article induced CP through ibotenic acid (IBA) administration in rat (Wistar), in the post-natal period (5th or 7th day of post-natal life) (Table 2). As for verified outcomes, LPS administration caused a lack of coordination of sucking and swallowing and reduced head movements during feeding rabbits on 1st day of post-natal life. Administration of IBA, assessed from the 28th day of post-natal life, led to damage the reach and acquisition of food (Table 2).

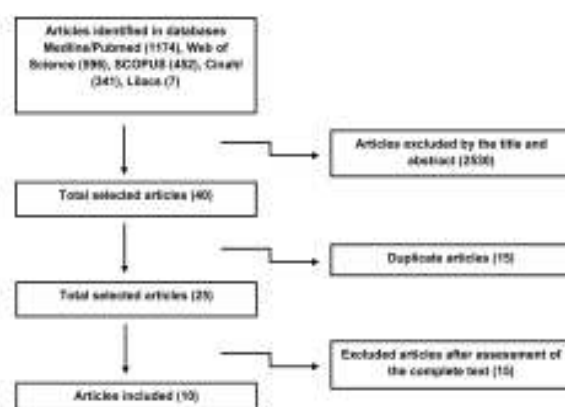


Fig. 1. Scheme of stages of selection of articles.

Table 3. Restroom quality conditions evaluated by the items highlighted by Roswigmans *et al.* (27)

Author/Year	Accommodation	Lighting	Temperature	Water/fillet	Code of ethics
Fadous Saadani <i>et al.</i> , 2008 (28)	–	–	+	+	+
Aiqing Chen <i>et al.</i> , 2008 (42)	–	–	–	–	+
Sidhartha Tan <i>et al.</i> , 2005 (29)	+	–	+	+	–
Matthew Derrick <i>et al.</i> , 2004 (30)	+	–	+	–	+
Sujatha Kannan <i>et al.</i> , 2011 (33)	+	–	–	–	+
Caroline O. Chua <i>et al.</i> , 2015 (31)	–	–	+	+	+
Matthew Derrick <i>et al.</i> , 2007 (34)	–	–	–	–	–
Janani Ralavabramanian <i>et al.</i> , 2006 (32)	+	+	–	+	+
Alexander Drabyshevsky <i>et al.</i> , 2012 (35)	–	–	–	–	+
Alexander Drabyshevsky <i>et al.</i> , 2006 (36)	–	–	–	–	–

Regarding the studies that made use of intraventricular haemorrhage for CP induction, one article used glycerol administration in rabbits in the neonatal period (2 h of life). One other study made use of autologous blood infusion in rats during the neonatal period (24–36 h on the 1st day of post-natal life) (Table 3). The administration of glycerol did not cause damage on the 14th day of post-natal life. In contrast, autologous blood infusion resulted in damage to the range and acquisition of food in the 70th day of post-natal life in rats (Table 3).

Finally, the five articles that used hypoxia-ischemia as a model of CP induction were all carried out in rabbits and rating parameters of oral functions were performed on the 1st day of post-natal life. However, variability was observed for the period of induction of hypoxia-ischemia, although all were carried out

during pregnancy. Thus, one article held induction during the intermediate pregnancy (21st, 22nd and 25th) and final (28th and 29th) days of pregnancy; one during the 21st and 22nd or 29th days of pregnancy; one during the 21st and 22nd days of pregnancy; one during the 21st and 22nd days of pregnancy; and two during pregnancy on the 22nd day of gestation (Table 4). As for the observed outcomes, hypoxia-ischemia promoted incoordination of sucking and swallowing, impaired olfactory aversive response and reduction in head movements during feeding on the 1st day of post-natal life (Table 4).

Discussion

Systematic reviews of experimental studies have provided important information in understanding the underlying mechanisms involved in disease. These

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

Author/Year	Animal (Species)	CP model	Induction period	Age assessment	Results
Radoua Saadani <i>et al.</i> , 2008 (28)	Rabbit	Inflammation (LPS administration)	Gestational period (28th day of pregnancy)	1st day of post-natal life	1 – Incoordination of sucking and swallowing 2 – Reduction in head movements during feeding
Aiqing Chen <i>et al.</i> , 2008 (42)	Rat (Wistar)	Inflammation (LPS administration)	Post-natal period (5th or 7th day of post-natal life)	From 28th day of post-natal life	1 – Failure to achieve and acquire food
Sujatha Kannan <i>et al.</i> , 2011 (33)	Rabbit	Inflammation (LPS administration)	Gestational period (28th day of pregnancy)	1st day of post-natal life	1 – Incoordination of sucking and swallowing

Table 3. Sample characterisation and results found for intraventricular haemorrhage models

Author/Year	Animal (Species)	CP model	Induction period	Age assessment	Results
Caroline O. Chiu <i>et al.</i> , 2015 (31)	Rabbit	Intraventricular haemorrhage (Autologous blood infusion)	Neonatal period (2 h of life)	14th day of post-natal life	1 – No damage was observed
Janani Balasubramanian <i>et al.</i> , 2006 (32)	Rat (Sprague Dawley)	Intraventricular haemorrhage (Autologous blood infusion)	Neonatal period (24–36 h at the 1st day of post-natal life)	70th day of post-natal life	1 – Failure to achieve and acquire food

data can assist the scientific community in making evidence-based decisions. In this context, this systematic review aims at bringing together studies that have assessed the impact on oro-facial functions caused from CP induction in experimental models. The synthesis and analysis of the collected data, in particular those related to the control of oro-facial functions such as sucking, chewing and swallowing, would allow clarifying the underlying mechanisms associated with these events. However, the transition of the findings to clinical practice should be carried out carefully.

We found that the assessed studies present vast heterogeneities, in particular those related to the CP model, the animal species assessed, the CP induction period, and age assessment, making unfeasible the application of a meta-analysis.

The CP induction period was performed either during pregnancy, during parturition, or in the first days of post-natal life. In models that were induced during parturition or in the first days of life, the damage was provoked directly in the pups. CP models that were induced during pregnancy were achieved by a maternal insult and consequent cerebral damages in the

pups. In models based on inflammation, the intrauterine administration of LPS on mothers promoted substantial activation of microglia in the pups' brain, which is typical of CP (28, 33). For models based on hypoxia-ischemia, pregnant females were submitted to uterine ischaemia, in order to attempt an insult of placental insufficiency to premature infants (29, 30, 34–36). This model causes global hypoxia in the fetuses, accompanied by an immediate decrease in the cerebral blood flow of the pups, which results in neurological damage (30).

Among the experimental models, we observed that those based on maternal hypoxia-ischemia appear patterned, varying only the period of induction of hypoxia-ischemia. However, despite this, all studies induced hypoxia-ischemia during pregnancy, and the only difference among them is the pregnancy stage (initial, intermediate or final). Moreover, models of hypoxia-ischemia are effective in the reproduction of several oro-facial parameters, despite having a high mortality rate (41%, 42% and 50%) (29, 30).

Studies have shown that experimental models of CP were able to reproduce the characteristics and

Table 4. Characterisation of the sample and results found in hypoxia-ischemia models

Author/Year	Animal (Species)	CP model	Induction period	Age assessment	Results
Sidhantha Tan <i>et al.</i> , 2005 (29)	Rabbit	Hypoxia-ischemia	Gestational period (21st, 22nd and 25th days of pregnancy) and final (28th and 29th days of pregnancy)	1st day of post-natal life	1 – Incoordination of sucking and swallowing 2 – Impaired olfactory aversive response 3 – Reduction in head movements during feeding
Matthew Derrick <i>et al.</i> , 2004 (30)	Rabbit	Hypoxia-ischemia	Gestational period (21st and 22nd days of pregnancy)	1st day of post-natal life	1 – Incoordination of sucking and swallowing 2 – Reduction in head movements during feeding
Matthew Derrick <i>et al.</i> , 2007 (34)	Rabbit	Hypoxia-ischemia	Gestational period (21st and 22nd or 29th days of pregnancy)	1st day of post-natal life	1 – Incoordination of sucking and swallowing 2 – Impaired olfactory aversive response
Alexander Drobyshchey <i>et al.</i> , 2012 (35)	Rabbit	Hypoxia-ischemia	Gestational period (22nd day of pregnancy)	1st day of post-natal life	1 – Impaired olfactory aversive response
Alexander Drobyshchey <i>et al.</i> , 2006 (36)	Rabbit	Hypoxia-ischemia	Gestational period (22nd day of pregnancy)	1st day of post-natal life	1 – Impaired olfactory aversive response

damages of this disturb. The experimental models of CP induced in different studies are similar to spastic CP (30, 34). Spastic CP may present as spastic diplegia (involvement of the legs with a slight effect on the arms), hemiplegia (involvement of the leg and ipsilateral arm) and quadriplegia (involving the four limbs) (5). In addition, motor alterations observed in individuals with spastic CP may affect oro-facial functions such as speech and swallowing (4).

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

In particular, the models of hypoxia-ischemia and maternal inflammation promoted incoordinated sucking and swallowing. This parameter was evaluated by the protocol of Derrick *et al.* (30). Briefly, the animals were individually filmed on a flat surface during

feeding. Sucking and swallowing were assessed by introduction of a formula into the pups' mouth with a plastic pipette. An incoordination of sucking and swallowing was observed in CP animals, which was evidenced from nasal regurgitation of milk, inability to retain milk in the oral cavity and loss of all milk contents by drip (28–30, 33, 34). In humans, it has been observed that this damage in coordinating suction, breathing and swallowing bolus (22) leads to recurrent aspiration to the interior of the airways and consequently chest infections and lung problems (37, 38). The difficulty of retaining solid foods or fluids within the oral cavity contributes to the poor nutritional status and dehydration (11, 21, 22).

The mobility of the head was also evaluated by the protocol of Derrick *et al.* (30). This consisted on offering milk in a plastic pipette on the side of the animals' mouths. The delay or absence of head mobility from the milk supply of stimulus in the side of his mouth was observed in animals that suffered hypoxia-ischemia or maternal inflammation. In children, a deficit in the movements of the head, neck, trunk and upper limbs, while feeding is often observed (22), as well as a reduction in the sucking reflex (39). For effective oral functioning during feeding it is necessary to have head stability for better control of the jaw (40). The

head control is influenced by the trunk line (40). Therefore, these deficits in body movements result in reduced dietary intake, prolonged feeding time and poor nutritional status (41).

The ability to achieve and acquire food was evaluated by the capacity of the animals to use the forepaws to feed (32, 42). This was assessed by observing if the animal reached the food, grasped it and fed without dropping the pellet. Results revealed that animals with CP by subsequent post-natal inflammation or intraventricular haemorrhage had difficulties in using the forepaws to reach and manipulate the food accurately, and would drop the pellet frequently (32, 42). Children with CP often are unable to maintain and manipulate food on the tongue, and often drop it from their mouths (21). Furthermore, severe cerebral asymmetries associated with poor sitting posture during feeding are observed in children with CP (39). These abnormalities impair the coordinated use of hands to conduct the food to the mouth (43), leading to an inadequate intake of nutrients (43). In summary, the precariousness of oro-facial functions correlates with increased limitations in gross motor function and increased limitations in manual abilities (44). However, we found no studies in the literature that addressed the postural control during feeding, nor the control of salivation or food consumption.

Furthermore, odour sensitivity was tested by aversive response to a cotton swab soaked with odorant [peppermint or pure ethanol (29) and amyl acetate (34–36)]. The absence or delay of the aversive response elicited by olfactory stimulation was observed in models of hypoxia-ischemia during the gestation period. Mathew Derrick *et al.* (30) observed extensive degeneration of the piriform cortex induced by hypoxia-ischemia during pregnancy. The piriform cortex is considered the main area that integrates and transmits the information to the olfactory bulb olfactory (35, 36). It is suggested that the injury in this region may explain the absence or delay in aversive olfactory response in animals subjected to oxygen deprivation. However, more experimental studies are needed to investigate other mechanisms that explain the basis of these behavioural and motor findings.

These motor damages may be associated with changes in the nervous system of animals due to CP. Most studies show the activation of microglia in various segments of the brain, especially in the white matter (corpus callosum, periventricular region,

internal capsule and corona radiata) (28, 30, 33, 42). Activated microglia and oligodendrocytes promote neuronal injury, as occurs in hypomyelination and neuronal loss in noble areas of the central nervous system (28, 33). An increase in the number and hypertrophy of astrocytes in multiple areas of the white matter is also observed, particularly in the periventricular area (31, 32, 42). These findings impair the blood supply and the availability of oxygen and glucose in the nerve tissue (45).

Coupled with the changes in the nervous system, there are significant changes in the muscular system. Animals with CP had an increased tone (spasticity) of the muscles of the anterior and posterior paws associated with postural abnormalities, righting reflex deficits, changes in gait and reduced locomotor activity (28–31, 33, 34). The intensity, duration and quality of movements of the head, forelegs and hind legs have been reduced in these animals (26). These studies have observed that increased muscle tone relates to injury to the white matter observed in regions such as the internal capsule and corona radiata (33, 34). Fadoua Saadani *et al.* (28) suggested that the increased muscle tone observed in animals with CP is explained by the activation of microglia, especially in white matter brain. These motor deficits impair posture and mobility necessary for proper oral function.

Regarding the disorders in muscle oro-facial functions, animals subjected to CP induction presented changes in sucking and swallowing reflexes (28–30, 33, 34). Children with CP present abnormalities in the maturation of muscles related to oro-facial functions (45), hypertonia of the muscles that close the jaw (46), reduced bite during food intake force (47), weak suction (39), reduction in the lip seal (22), poor control of the lips and tongue (22) and reduced pharyngeal motility (22). These changes in the oro-facial muscles contribute to incoordination of sucking and swallowing.

Our study has some limitations. For instance, the articles included evaluated different sensory and motor functions in experimental CP models. The variability in oro-facial functions was due to heterogeneities related mainly to the animal species and the CP induction method. Studies with rabbits have been used to evaluate a wider range of oro-facial functions. However, studies using rats are more restricted in assessing the motor skills of the forepaws during feeding. Regarding the CP induction method, the

hypoxia-ischemia models reproduce a larger spectrum of oro-facial abnormalities compared to the other models. This can be explained by the fact that hypoxia-ischemia provokes an injury in the myelination of sensory and motor nerve fibers, thus affecting the appearance of several sequelae (29).

Thus, the effects on the oro-facial functions observed in the articles included in this systematic review are similar to the typical clinical problems of CP. The impairment in oro-facial functions limit growth, nutrition and general health of the child (47). In addition, studies show that depending on the degree of oro-facial deficits, the prognosis of CP may be more reserved in relation to the mortality rate (48). However, the current treatments proposed are ineffective in minimising oro-facial dysfunctions affecting many children in the world. In this context, this work clarifies the adverse effects induced by experimental models of CP and some mechanisms underlying the alterations in oro-facial functions.

Conclusion

All CP experimental models analysed modify the oral functions and periods in different animal species. The hypoxia-ischemia cause changes in the sensory and motor oro-facial functions in most of the parameters analysed. However, the inflammation model was more effective in damaging the coordination between sucking and swallowing. Studies investigating the mechanisms underlying oro-facial damage should be performed in order to optimise treatment strategies offered for children with CP and minimise the oro-facial damage inherent to this disorder.

Conflict of interest

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

Author contributions

The authors' contributions are as follows: Diego Cabral Lacerda, Kelli Nogueira Ferraz-Pereira, André Terácio, Raül Manhães de Castro and Ana Elisa Toscano conceived the study, designed the experiments, analysed the data and wrote the manuscript; Bárbara

Juacy Rodrigues Costa de Santana and Omar Guzman Quevedo contributed to the writing of the manuscript. All the authors read and approved the final version of the manuscript. The authors are grateful to Ashley C. Jankiewicz for the language review of this work.

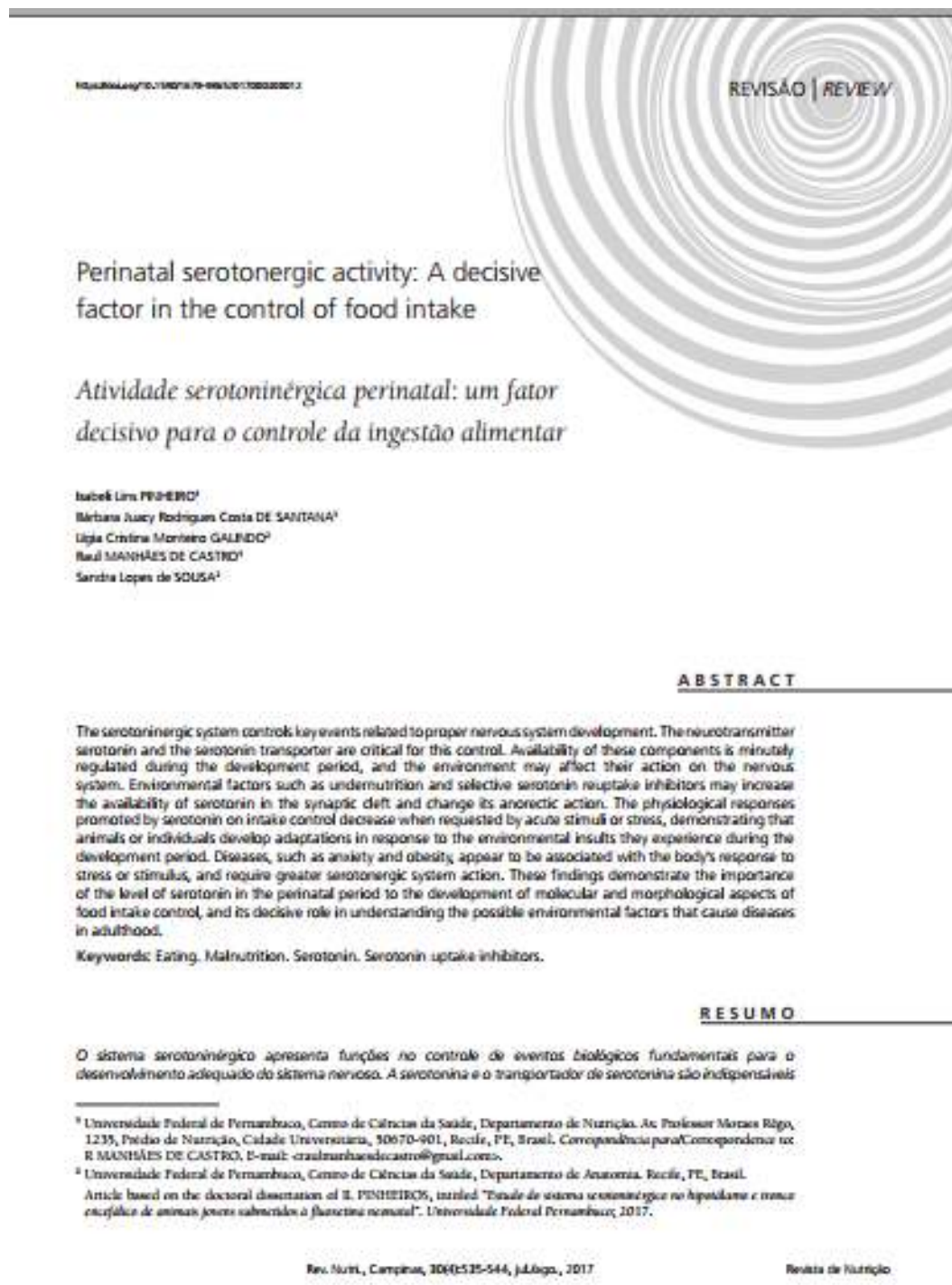
References

- Rosenbaum P, Paneth N, Leviton A, Goldstein M, Bax M, Damiano D *et al.* A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl.* 2007;109:8–14.
- Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P, Leviton A, Paneth N, Dan B *et al.* Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Dev Med Child Neurol.* 2005;47:571–576.
- Koman LA, Smith BP, Shilt JS. Cerebral palsy. *Lancet.* 2009;363:1619–1631.
- Yeorgin-Alsopp M, Van Nauden Braun K, Doernberg BS, Bender 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.* 2009;123:547–554.
- Stanley FL, Watson L. Trends in perinatal mortality and cerebral palsy in Western Australia, 1967 to 1985. *BMJ.* 1992;304:1656–1661.
- Krigger KW. Cerebral palsy: an overview. *Am Fam Physician.* 2006;73:99–100.
- Gladstone M. A review of the incidence and prevalence, types and aetiology of childhood cerebral palsy in resource-poor settings. *Ann Trop Paediatr.* 2010;10:181–196.
- 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.
- Kowak J, Hines M, Goldsmith S, Barclay R. Clinical prognostic messages from a systematic review on cerebral palsy. *Pediatrics.* 2012;130:e1285–e1312.
- De Jersey MC. An approach to the problems of orofacial dysfunction in the adult. *Aust J Physiother.* 1975;21:5–10.
- 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–e307.
- Staffings VA, Charney EL, Davies JC, Cronk CE. Nutritional status and growth of children with diplegic or hemiplegic cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 1993;35:997–1006.
- Reid SM, McCurcheon J, Reddihough DG, Johnson IL. Prevalence and predictors of drooling in 7- to 14-year-old children with cerebral palsy: a population study. *Dev Med Child Neurol.* 2002;44:1032–1036.
- Parkes J, Hill N, Platt MJ, Dornally C. Oromotor dysfunction and communication impairments in children with cerebral palsy: a register study. *Dev Med Child Neurol.* 2010;52:1113–1119.
- Strauss DJ, Shavelle RM, Anderson TW. Life expectancy of children with cerebral palsy. *Pediatr Neurol.* 1998;18:143–149.

47. Krick J, Van Duyn MA. The relationship between oral-motor involvement and growth: a pilot study in a pediatric population with cerebral palsy. *J Am Diet Assoc.* 1984;84:555-559.
48. Sullivan PH, Lambert B, Rose M, Ford-Adams M, Johnson A, Griffiths P. Prevalence and severity of feeding and nutritional problems in children with neurological impairment: Oxford Feeding Study. *Dev Med Child Neurol.* 2000;42:674-680.

Correspondence: Kelli Nogueira Ferraz-Peres, Department of Physical Education and Sports Science, Centro Acadêmico de Vitória – UFPE, Rua Alto da Reservatória, S/N – Bela Vista, CEP 55688-680 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.
E-mail: kelli.ferraz@hotmail.com

APÊNDICE C - OUTRAS PUBLICAÇÕES DURANTE O MESTRADO (ARTIGO PUBLICADO 1)



para esta função de controle. A disponibilidade destes componentes é precisamente regulada durante o período de desenvolvimento, e podem sofrer interferências provenientes do ambiente alterando sua ação sobre o sistema nervoso. A desnutrição, a inibição da recaptação da serotonina a partir de fármacos e mudanças na expressão de gênica do transportador de serotonina na gestação e lactação podem induzir o aumento de serotonina alterando sua ação anoréxica. As respostas fisiológicas desempenhadas pela serotonina no controle da ingestão exibem uma resistência quando requisitadas por estímulos ou estresses agudos, demonstrando que os animais ou indivíduos desenvolvem adaptações de acordo com as agressões ambientais sofridas no período de desenvolvimento. Patologias como, anorexia e obesidade, parecem estar associadas à resposta do organismo a um estresse ou estímulo, necessitando de uma maior ação do sistema serotoninérgico. Estes achados demonstram a importância do conteúdo da serotonina no período perinatal ao desenvolvimento de aspectos moleculares e morfológicos do controle da ingestão alimentar, e sua função determinante para a compreensão das possíveis influências ambientais causadoras de patologias na vida adulta.

Palavras-chave: ingestão de alimentos. Desnutrição. Serotonina. Inibidores da captação de serotonina.

INTRODUCTION

The serotonergic system is essential for the proper development of the nervous system. Serotonin or 5-Hydroxytryptamine (5-HT) and Serotonin Transporter (SERT) are essential for nervous system ontogenesis and maturation [1]. Environmental factors, such as malnutrition, selective serotonin reuptake inhibition, and changes in the expression of the serotonin transporter gene during the early stages of development may increase central serotonin availability, delay in satiety the trigger associated with hyperphagia, and reduce its anorexigenic effects in adult organisms [2-4]. However, despite the numerous studies conducted in recent years, the origin of the physiological and molecular mechanisms controlled by the serotonergic system has not been totally clarified. This review article focuses on the influence of serotonergic activity during the development period on food intake control.

Critical development period and phenotypic plasticity

Phenotypic plasticity is established to develop a central function on the etiology of chronic-degenerative diseases associated with the hypothesis of the development-related origin of health and disease. The risk of developing chronic diseases is closely related to the environment in which an individual developed

and his lifestyle in adulthood. Phenotypic plasticity is considered an adaptive process that allows the refinement of development patterns and mechanisms according to the surrounding environment. From the adaptive perspective, an individual will be benefitted by his ability to adapt to the environment [5].

Pieces of evidence of these adaptations in humans were demonstrated in 1970 by Ravelli et al. [6]. The Dutch Famine consisted of a period of food scarcity experienced by pregnant women during World War II (1944-1945). In adulthood, approximately 300,000 men exhibited changes in body composition, depending on the time in which they, as fetuses, had been exposed to maternal malnutrition. If malnutrition occurred in the last trimester of pregnancy, these individuals would have a low incidence of obesity. However, if it occurred in the first trimester, they would have a higher incidence of obesity [6].

In the 1960s Neel [7] described the 'thrifty genotype hypothesis', proposing that some populations were more susceptible to insulin resistance because of its possible relationship with environmental or genetic factors. The body's adaptation could benefit individuals who were exposed to food scarcity [7]. Some hypotheses had been explored by Neel [7], leading to a greater understanding of the importance of the gestation and breastfeeding periods to disease susceptibility in adult life. Certain subjects, such as metabolic programming and critical

induction of phenotypic changes in offspring promoted by the mother may involve changes in the epigenome secondary to changes in DNA methyltransferase activity and histone structures [12]. In this review we describe the environmental influences that are associated with serotonin level in the central nervous system, such as malnutrition, selective serotonin reuptake inhibition, and change in serotonin transport gene expression during the development period. These influences promote structural, physiological, and behavioral changes, especially in food intake control.

Serotonergic system and development

Serotonin or 5-hydroxytryptamine is a monoamine widely distributed in the central nervous system. During development, it acts as a cell signaling agent, neuromodulator, hormone, and neurotransmitter, and its function may vary depending on the region in which it is located and the body's development and maturation phase. This molecule influences the induction of neurogenesis, neuronal differentiation, and synaptogenesis, and allows self-regulation of serotonergic neurons and development of target tissues [13]. Control of these biological events is essential for the proper development of the central nervous system. The first studies were able to identify the central serotonin level, morphology of its neurons, and components of this neurotransmission system, the enzyme Tryptophan Hydroxylase (TPH), the Serotonin Transporter (SERT), and the presence of serotonin [1,14-16].

In the human brain, 5-HT neurons first appear in the brainstem in the fifth week of intrauterine life [14]. Brain levels of 5-HT increase during intrauterine life until age two years, stabilize for a few years, then peaks at age five years [17]. In rodents serotonergic neurons appear between days 10 and 12 of intrauterine life, with serotonin synthesis detected one day

after their appearance; they complete their maturation at the end of the critical period [1,15]. After their appearance, serotonergic neurons emerge from the raphe nuclei in order to modulate the development and maturation of neuronal circuits in the hypothalamus, nucleus of the solitary tract, and cerebral cortex [15,18,19].

Since serotonin is hydrophilic and does not cross the blood-brain barrier, it must be synthesized in the brain from the essential amino acid tryptophan. This amino acid must be present in the diet as the body cannot synthesize it [20]. Central serotonin synthesis occurs mainly in serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. Plasma tryptophan is either free or bound to albumin. Once it enters the neuron, tryptophan is hydrolyzed to 5-Hydroxytryptophan (5-HTP) by the enzyme TPH-2 present in the central nervous system [16]. Next, 5-HTP is decarboxylated by the enzyme aromatic L-amino acid decarboxylase to form serotonin.

After its synthesis in raphe neurons, serotonin is stored in vesicles present in pre-synaptic neurons. When free in the synaptic gap, 5-HT can act in its receptors, but after this interaction, its action ends. One of the degradation pathways of serotonin is performed by the enzymes monoamine oxidase A and B, breaking down serotonin into 5-hydroxyindoleacetic acid [21]. A second mechanism of serotonin degradation regards its reuptake by its transporter, located in the pre-synaptic membrane [22]. SERT is the main agent responsible for the regulation of 5-HT levels in the synaptic gap. The function of this cell membrane protein is to reuptake 5-HT that has not been broken down by monoamine oxidase in the synaptic gap and transfer it to the inside of the pre-synaptic neurons [22]. Active removal increases the speed in which the levels of neurotransmitter in the synaptic gap decrease, restricting the effects of 5-HT to smaller areas, and recycles some of the neurotransmitter released in the synapse for later use [22]. By changing its conformation, SERT moves one

or more serotonin molecules per cycle, unlike transmembrane channels, which remain open or closed. This allows molecules to exit the lipid-bilayered membrane.

Serotonin levels during nervous system development are minutely regulated, allowing early detection of intense serotonergic immunoreactivity [1]. During gestation, the placenta can synthesize and transport serotonin using a complex system of maternal conversion of tryptophan, the amino acid precursor of serotonin, into serotonin, releasing it in the fetal circulation [23]. A prenatal increase in tryptophan availability may prevent hyperinnervation of serotonergic neurons. This increase delays the development of serotonergic axons and reduces the synthesis of 5-HT [24]. Serotonergic innervation goes through hyperinnervation phases or temporary expression of some serotonergic receptors, which may be decisive for the participation of serotonin on the development and plasticity of the central nervous system. In mammals, the final density and distribution of serotonergic terminals are shaped during the postnatal maturation of the central nervous system [1]. Excess 5-HT during embryogenesis in SERT knockout animals reversibly reduces the radial migration speed of cortical pyramidal neurons, affecting the arborization of these neural circuits. The receptor 5-HT₆, expressed in pyramidal neuron progenitors when activated, replicates the effects of serotonergic stimulation [19]. These findings support the hypothesis that serotonergic homeostasis deregulation during development may affect the formation of the neocortical circuit and contribute to increase susceptibility to psychiatric disorders [19]. However, initiation of growth and innervation of serotonergic neurons may be an important inductor of structural and behavioral abnormalities.

Serotonergic neurons are widely distributed in rodent brain. Its projections originate at the raphe nuclei, located along the brainstem midline, and consist of numerous and distinctive groups of neurons that organize themselves, sending

out ascending and descending projections [1,25]. Two groups of serotonergic neurons seem to have distinct maturation pattern and migration. The rostral group, formed by the dorsal, caudal linear, and median raphe nuclei send predominantly rostral projections to the thalamus and hypothalamus. On the other hand, the caudal group formed by the nuclei raphe pallidus, raphe obscurus, and raphe magnus projects more caudally and ventrally to innervate the spinal cord and cerebellum [1,25]. Because of its widespread distribution in the central nervous system, serotonin influences many mammalian physiological spheres, from cardiovascular, respiratory, gastrointestinal, pain sensitivity, and thermogenic regulation to appetite, circadian rhythm, eating and sexual behavior, humor, locomotion, sleep, learning, and memory [26].

The development of the serotonergic properties of raphe neurons, such as serotonin synthesis, reuptake, and storage depend on a positive feedback system based on the presence of small amounts of 5-HT in order to initiate its own synthesis and stimulate the development of these properties, even in neurons that normally do not produce 5-HT [27]. This mechanism may be responsible for the quick development of serotonergic neurons and for the transitory presence of 5-HT in some neurons during development [15]. The synthesis of 5-HT from tryptophan increases in response to the frequency of electrical stimulation of the serotonergic cell body [16,22]. Short-term requirements for higher 5-HT synthesis may occur by changing the kinetic properties of TPH without the need to increase TPH level [28]. Serotonergic neurotransmission balance may present an increase in its metabolic processes in order to adapt to the demands made by environmental stimuli and aggressions.

Serotonin and food intake

Diet may be primarily considered a regulatory behavior whose function is to provide

and nutritional status. The gene *slc6a14* regulates tryptophan availability for serotonin synthesis. Children aged 7 to 8 years with *slc6a14* (rs2312054) and *slc6a14* (rs12391221) polymorphisms in leukocytes have higher food intake [4]. This finding may indicate a possible association between these polymorphisms in adulthood obesity.

The interaction between nutrition in the critical development period, serotonin action, and repercussions in adulthood has been documented by many researchers [2,9,37-40]. Perinatal malnutrition is one of the environmental factors responsible for structural and functional changes in central nervous system development, such as fewer neurons, and changes in neuronal shape and neurotransmitter levels [2,41]. The serotonergic system is greatly influenced by perinatal malnutrition [2]. The brain levels of serotonin increase during the postnatal period and adulthood of animals submitted to perinatal protein malnutrition. These changes may be related to higher levels of tryptophan in the brain and to the activity of 5-TPH, confirming the need of finely controlling 5-HT availability in the brain during the critical development period [2]. These changes may stem from response changes in serotonin neurotransmission.

Perinatal protein malnutrition seems to reduce weight gain and food intake in rats [37-40]. These animals gain less weight as they grow and have lower weight in adulthood. Despite this lower body weight, perinatal protein malnutrition increases food intake [37,38]. In the neonatal period, protein malnutrition reduced masticatory efficiency, weakening and delaying masticatory muscle maturation and the associated neuronal circuit [39]. A functional change associated with neonatal malnutrition and food intake seems to decrease the inhibitory effects of tryptophan on food intake in adulthood [40]. This resistance to the inhibitory effects of serotonin has also been observed in malnourished animals in gestation and lactation when submitted to acute fenfluramine

administration [37]. Serotonin control on food intake seems to fail when protein intake during the critical development period is sufficiently low.

Understanding the regulation of gene expression, such as the mechanism of induction of different phenotypes promoted by maternal diet during the critical period, allows a better understanding of the relationship between serotonin and control of food intake. The absence of serotonin reuptake mechanism in SERT knockout animals increases the extracellular levels of serotonin [42]. Despite the hypophagic characteristic of 5-HT, these animals have an obese phenotype in adulthood [43]. The mechanism associated with this obese phenotype in these animals has yet to be completely understood. These obese rodents are not hyperphagic, but they present changes in their exploratory behavior, such as low physical activity in their cages [43]. This obese phenotype may be reverted in animals when SERT is upregulated, demonstrating a possible consequence of low extracellular levels of brain serotonin secondary to higher SERT expression. Animals with upregulated SERT have low body weight and no changes in food intake [44,45].

Some pharmaceuticals, such as fenfluramine, can increase 5-HT levels by stimulating vesicular release and inhibiting reuptake, which promotes hypophagia, smaller meals, and higher intervals between meals in rodents [37]. The function of fenfluramine is to suppress food intake and facilitate weight loss by increasing metabolic rate [37]. Pharmacological or genetic SERT inhibition also evidences the inhibition of food intake. Higher serotonin levels promoted by selective serotonin reuptake inhibitors result in lower food intake. Fluoxetine increases serotonin in the hypothalamus and its hypophagic action [33].

Exposure to selective serotonin reuptake inhibitors during lactation reduces body weight and food intake [3,46]. The use of citalopram during lactation decreased growth and delayed the maturation of rodents' physical

characteristics [47]. The body weight of rodents exposed to fluoxetine was 22% lower at age 21 days [46]. The low body weight phenotype persisted to adulthood in neonatal animals exposed to fluoxetine [3]. In rodents, fluoxetine increases serotonin, stimulating satiety, which reduces food intake and body weight [33]. The development of the appetite regulation pathways in the hypothalamus occur predominantly after birth [48]. These pieces of evidence indicate that the postnatal period is important for food intake programming in rodents.

Physiological responses present a resisted response to acute stimuli or stress, demonstrating that these organisms develop adaptations according to the manipulations they experience during development periods or critical periods, which cannot be resolved depending on the demands of a new environment. The development of anxiety, obesity, and other diseases seems to be associated with an organism's need to respond to a stress or stimulus that requires higher action of its control systems, such as the serotonergic system. These findings show the importance of perinatal serotonin in the development of molecular and morphological components in food intake control, and its determinant function for understanding the possible environmental influences that cause diseases in adulthood.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank our research group mates for their collaboration.

CONTRIBUTORS

All authors helped to idealize and discuss the subjects, and to write and edit the manuscript.

REFERENCES

1. Lidov H, Mølliver M. An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: Ascending pathways and terminal fields. *Brain Res. Bull.* 1982;8(4):389-430. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(82\)90077-6](https://doi.org/10.1016/0304-3940(82)90077-6)
2. Manjarez G, Chagoya G, Hernández R. Early nutritional changes modify the kinetics and phosphorylation capacity of tryptophan-5-hydroxylase. *Int J Dev Neurosci.* 1994;12(8):695-702. [https://doi.org/10.1016/0735-5748\(94\)90049-3](https://doi.org/10.1016/0735-5748(94)90049-3)
3. Galindo LCM, Barros MLD, Pinheiro IL, Santana RVC, Matos RJB, Leandro CG, et al. Neonatal serotonin reuptake inhibition reduces hypercaloric diet effects on fat mass and hypothalamic gene expression in adult rats. *Int J Dev Neurosci.* 2015;46:76-81. <https://doi.org/10.1016/j.devneu.2015.07.004>
4. Miranda R, Vetter S, Genro J, Campagnolo P, Mattivi V, Vitolo M, et al. SLC6A14 and 5-HT2C polymorphisms are associated with food intake and nutritional status in children. *Clin Biochem.* 2015;48(18):1277-82. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2015.07.003>
5. Wells J. Adaptive variability in the duration of critical windows of plasticity: Implications for the programming of obesity. *Evol Med Public Health.* 2014;2014(1):109-21. <https://doi.org/10.1093/emph/eou019>
6. Ravelli G, Stein Z, Susser M. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976;295(7):349-53. <https://doi.org/10.1056/NEJM197608122950701>
7. Neel JV. Diabetes Mellitus: A "thrifty" genotype rendered detrimental by "Progress"? *Am J Hum Genet.* 1962;14(4):353-62.
8. Dobbing J. Undernutrition and the developing brain: The relevance of animal models to the human problem. *Am J Dis Child.* 1970;120(5):411.
9. Morgane PJ, Miller M, Kemper T, Stern W, Forbes W, Hall R, et al. The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in the rat. *Neuro Sci Bio Behav Rev.* 1978;2(3):137-230. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(78\)90059-3](https://doi.org/10.1016/0149-7634(78)90059-3)
10. Hales C, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull.* 2001;60(1):5-20. <https://doi.org/10.1093/bmb/60.1.5>
11. Gluckman P, Hanson M, Low F. The role of developmental plasticity and epigenetics in human health. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2011;93(1):12-18. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20198>
12. Skinner MK, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reprod Toxicol.* 2011;31(5):727-43. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.10.012>
13. Whitaker-Azmitia PM, Druce M, Walker P, Lauder JM. Serotonin as a developmental signal. *Behav Brain Res.* 1996;73:19-29.

14. Sundström E, Kolare S, Souverbie F, Samuelsson EB, Pichera H, Lunell NO, et al. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Brain Res Dev Brain Res*. 1993;75:1-12.
15. Gaspar P, Cases O, Maroteaux L. The developmental role of serotonin: News from mouse molecular genetics. *Nat Rev Neuro Sci*. 2003;4(12):1002-12. <https://doi.org/10.1038/nrn1256>
16. Walther D, Peter JJ, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, et al. Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. *Science*. 2003;299(5603):76. <https://doi.org/10.1126/science.1078197>
17. Chugani DC, Muzik O, Behen M, Rothermel R, Janisse JJ, Lee J, et al. Developmental changes in brain serotonin synthesis capacity in autistic and nonautistic children. *Ann Neurol*. 1999;45(3):287-95.
18. Morton G, Cummings D, Baskin D, Barsh G, Schwartz M. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006;443(7109):289-95. <https://doi.org/10.1038/nature05026>
19. Riccio O, Jacobshagen M, Golding B, Vutsits L, Jabaudon D, Hornung, et al. Excess of serotonin affects neocortical pyramidal neuron migration. *Transl Psychiatry*. 2011;1(10):e47. <https://doi.org/10.1038/tp.2011.49>
20. Azmitia EC. Evolution of serotonin: Sunlight to suicide. In: Muller CP, Jacobs BL, editors. *Handbook of the behavioral neurobiology of serotonin*. London: Academic Press; 2010. p.3-22.
21. Szálán S, Yankovskaya V, Bernard S, Cronin C, Singer T. Isolation and characterization of an evolutionary precursor of human monoamine oxidases A and B. *Eur J Biochem*. 1998;253(1):270-9.
22. Sghendo L, Mifsud J. Understanding the molecular pharmacology of the serotonergic system: Using fluoxetine as a model. *J Pharm Pharmacol*. 2012;64(3):317-25. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01384.x>
23. Bonnin A, Levitt P. Fetal, maternal and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. *Neuroscience*. 2011;197:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.10.005>
24. Huether G, Thorike E, Adler L. Administration of tryptophan-enriched diets to pregnant rats retards the development of the serotonergic system in their offspring. *Dev Brain Res*. 1992;58(2):175-81.
25. Wallace JA, Lauder JM. Development of the serotonergic system in the rat embryo: An immunocytochemical study. *Brain Res Bull*. 1983;10(4):459-79.
26. Sodhi MS, Sanders-Bush E. Serotonin and brain development. *Int Rev Neurobiol*. 2004;59:111-74. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(04\)59006-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(04)59006-2)
27. De Vitry F, Harmon M, Catelon J, Dubois M, Thibault J. Serotonin initiates and auto-amplifies its own synthesis during mouse central nervous system development. *Proc Natl Acad Sci*. 1986;72(2):8629-33.
28. Hersler JG. Serotonin. In: Siegel GJ, Albers RW, Scott B, Price DD, editors. *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects*. San Diego: Academic Press; 2006. p.227-48.
29. Schwartz GJ. Integrative capacity of the caudal brainstem in the control of food intake. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006;361(1471):1275-80. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1862>
30. Jiang C, Fogel R, Zhang X. Lateral hypothalamus modulates gut-sensitive neurons in the dorsal vagal complex. *Brain Res*. 2003;980(1):31-47. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)02844-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)02844-0)
31. Zhang X, Cui J, Tan Z, Jiang C, Fogel R. The central nucleus of the amygdala modulates gut-related neurons in the dorsal vagal complex in rats. *J Physiol*. 2003;553(Pt 3):1005-18. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.045906>
32. Rinaman L. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res*. 2010;1350:18-34. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.059>
33. Halford JC, Harold JA, Lawton CL, Blundell JE. Serotonin (5-HT) drugs: Effects on appetite expression and use for the treatment of obesity. *Curr Drug Targets*. 2005;6(2):201-13. <https://doi.org/10.2174/1389450053174550>
34. Heisler L, Jobst E, Sutton G, Zhou L, Borok E, Thornton-Jones Z, et al. Serotonin reciprocally regulates melanocortin neurons to modulate food intake. *Neuron*. 2006;51(2):239-49. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.004>
35. Bendotti C, Samanin R. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OH-DPAT) elicits eating in free-feeding rats by acting on central serotonin neurons. *Eur J Pharmacol*. 1986;121(1):147-50.
36. Weiss GF, Rogacki N, Fueg A, Buchen D, Leibowitz SF. Impact of hypothalamic d-norfenfluramine and peripheral d-fenfluramine injection on macronutrient intake in the rat. *Brain Res Bull*. 1990;25(6):849-59.
37. Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhães de Castro R, Bolaños-Jiménez F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci*. 2008;27(6):1400-8. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06105.x>

38. Lira L, Almeida L, da Silva A, Cavalcante T, de Melo D, de Souza J, et al. Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. *Int J Dev Neurosci*. 2014;38:23-9. <https://doi.org/10.1016/j.jdevneu.2014.07.007>
39. Ferraz-Pereira K, da Silva Aragão R, Vendier D, Toscano A, Lacerda D, Manhães-de-Castro R, et al. Neonatal low-protein diet reduces the masticatory efficiency in rats. *Br J Nutr*. 2015;114(9):1515-30.
40. Carvalho-Santos J, Queirós-Santos A, Morais GL, Santana LH, Brito MG, Araújo RCS, et al. Efeito do tratamento com triptofano sobre parâmetros do comportamento alimentar em ratos adultos submetidos à desnutrição neonatal. *Rev Nutr*. 2010;23(4):503-11. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400001>
41. Resnick D, Miller M, Forbes W, Hall R, Kemper T, Bronzino J, et al. Developmental protein malnutrition: influences on the central nervous system of the rat. *Neurosci Biobehav Rev*. 1979;3(4):233-46.
42. Mathews T, Fedele D, Coppelli F, Avila A, Murphy D, Andrews A. Gene dose-dependent alterations in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression. *J Neurosci Methods*. 2004;140(1-2):169-81. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.05.017>
43. Holmes A, Murphy DL, Crawley JN. Evaluation of antidepressant-related behavioral responses in mice lacking the serotonin transporter. *Neuropsychopharmacology*. 2002;27(6):914-23. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(02\)00374-3](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(02)00374-3)
44. Jennings K. Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J Neurosci*. 2006;26(35):8955-64. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5356-05.2006>
45. Pringle A, Jennings K, Line S, Bannerman D, Higgs S, Sharp T. Mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter show no alterations in feeding behaviour and increased non-feeding responses to fenfluramine. *Psychopharmacology*. 2008;200(2):291-300. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1206-8>
46. Silva CM, Gonçalves L, Manhães-de-Castro R, Nogueira ML. Postnatal fluoxetine treatment affects the development of serotonergic neurons in rats. *Neurosci Lett*. 2010;483(3):179-83. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.08.003>
47. Deiró T, Manhães-de-Castro R, Cabral-Filho J, Souza S, Freitas-Silva S, Ferreira L, et al. Neonatal administration of diazepam delays somatic maturation in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(10):1503-9. <https://doi.org/10.1590/S0100-87592004001000009>
48. Grove KL, Smith MS. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiol Behav*. 2003;79(1):47-63. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00104-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00104-5)

Received: August 8, 2016
 Final version: March 27, 2017
 Approved: May 5, 2017

ANEXO A - COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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

fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 20 de fevereiro de 2018.

Ofício nº 02/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**
Departamento de Nutrição
Centro da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **0040/2016**

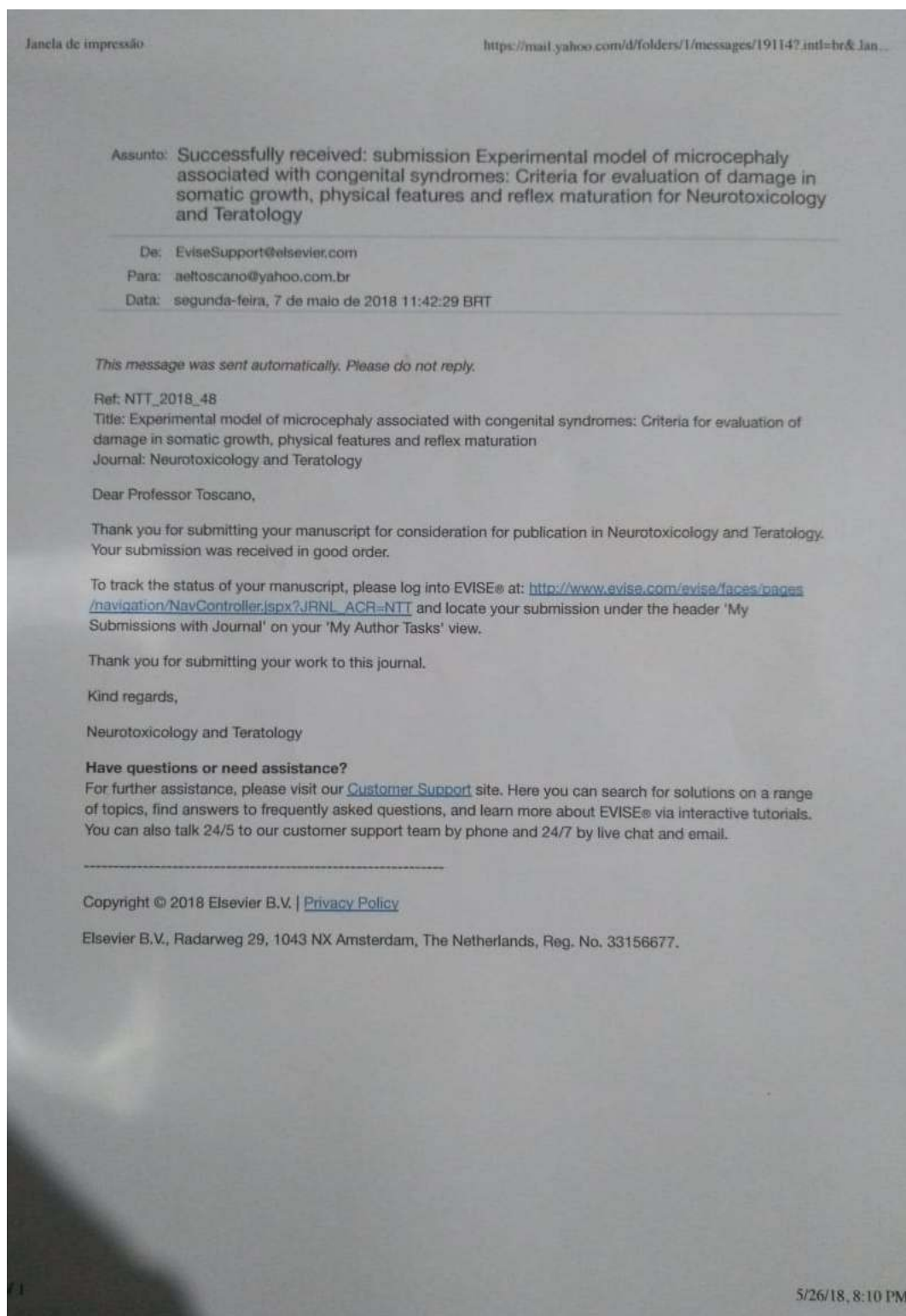
Certificamos que a proposta intitulada "**Microcefalia experimental: estudo do desenvolvimento somático, sensório-motor, coordenação motora e do fenótipo muscular esquelétrico em neonatos**", registrada com o nº **0040/2016** sob a responsabilidade de **Prof. Raul Manhães de Castro** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 05/12/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	04/2017 até 03/2019
Espécie/ linhagem/raça	Rattus norvegicus-linhagem wistar
Nº de animais	200
Peso/Idade	220g-250g/90-120 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Bioterio do Departamento de Nutrição-CCS/UFPE

Atenciosamente,



Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCS - UFPE
SIAPE 1801584

ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO 1º ARTIGO

ANEXO C - HISTÓRICO ESCOLAR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
HISTÓRICO ESCOLAR *STRICTO SENSU*
(Baseado na Res. nº 10/2008 do CCEPE-UFPE)



DADOS PESSOAIS DO ALUNO

NOME: BARBARA JUACY RODRIGUES COSTA DE SANTANA CPF: 100.085.154-98
 FILIAÇÃO: EDIGIANEIDE RODRIGUES COSTA DE SANTANA E MARCELON JOSÉ DE SANTANA
 DATA NASCIMENTO: 13/03/1994
 CIDADE: RECIFE ESTADO/PAÍS: PE
 IDENTIDADE: 5.899.596 ORG. EXP.: SDS-PE DATA: 07/07/2018

DADOS DO CURSO

Escolha o nome do Programa na lista suspensa
 NÚMERO DA PORTARIA DE RECONHECIMENTO: 524/2008 NÍVEL: MESTRADO
 CONVÊNIO COM OUTRA IES: ☐ SIM ☒ NÃO ☐ TIPO: Escolha na lista suspensa
 Em caso de convênio, especificar o nome da IES brasileira ou estrangeira:
 ÁREA CONCENTRAÇÃO: NEUROCIÊNCIAS
 LINHA DE PESQUISA: NEUROFARMACOLOGIA
 DATA MATRÍCULA INICIAL: 03/2017
 DATA DA COLAÇÃO DE GRAU:
 ORIENTADOR (A): Profª Dra. ANA ELISA TOSCANO MENESES DA SILVA CASTRO

DADOS ACADÊMICOS

RENDIMENTO ACADÊMICO (valor numérico, calculado em conformidade com o Art. 29 da Res. nº 10/2008 do CCEPE-UFPE) 3,7

CÓDIGO	DISCIPLINAS OBRIGATORIAS CURSADAS	CARGA HORÁRIA	CRÉDITOS DA DISCIPLINA	SEMESTRE /ANO	CONCEITO OBTIDO	CRÉDITOS OBTIDOS
DNP-902	METODOLOGIA DA PESQUISA CIENTÍFICA	60	4	2017.1	A	4
DNP-919	SEMINÁRIOS AVANÇADOS EM NEUROTRANSMISSÃO	60	4	2017.2	A	4
DNP-940	SEMINÁRIOS EM NEUROCIÊNCIAS	60	4	2017.2	C	4
DNP-941	TEORIAS EPISTEMOLÓGICAS	60	4	2017.1	A	4
DNP-942	NEUROCIÊNCIA E COMPORTAMENTO	60	4	2017.2	A	4
TOTAL DE CRÉDITOS OBRIGATORIOS OBTIDOS (1)						20

CÓDIGO	DISCIPLINAS ELETIVAS CURSADAS	CARGA HORÁRIA	CRÉDITOS DA DISCIPLINA	SEMESTRE /ANO	CONCEITO OBTIDO	CRÉDITOS OBTIDOS
DNP-924	COGNIÇÃO E MEMÓRIA	45	3	2017.1	A	3
DNP-933	TEORIA DA MENTE	45	3	2017.1	A	3
DNP-944	SEMINÁRIOS AVANÇADOS EM NEUROCIÊNCIAS II	45	3	2018.2	A	3
TOTAL DE CRÉDITOS ELETIVOS OBTIDOS (2)						9

TÍTULO DA TESE/DISERTAÇÃO: MICROCEFALIA EXPERIMENTAL: ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO, SENSORIO-MOTOR, COORDENAÇÃO MOTORA E DO FENÓTIPO MUSCULAR ESQUELÉTICO EM RATOS JOVENS DATA DA DEFESA: 25/02/2019 CONCEITO (*): APROVADA OUTROS (conforme Regimento do curso) (3):

TOTAL GERAL DE CRÉDITOS OBTIDOS (1+2+3) 29

(*) Colocar: **APR** - aprovado **REP** - reprovado

Aproveitamento de créditos da UFPE: ☐ SIM ☒ NÃO ☐ Quantidade Total: _____
 Nome do(a) Programa(s): _____
 Aproveitamento de créditos cursados em outras IES: ☐ SIM ☒ NÃO ☐ Quantidade Total: _____
 Nome do(a) Programa(s): _____
 Outros valores: _____

DADOS GERAIS

EXAME DE QUALIFICAÇÃO: ☒ SIM ☐ NÃO ☐ Data: 13/07/18 Resultado: APROVADA
 TRANCAMENTO DE MATRÍCULA (Conforme resolução vigente): ☐ SIM ☒ NÃO ☐ Data: _____ Período: _____
 PRORROGAÇÃO DE CURSO (Conforme resolução vigente): ☐ SIM ☒ NÃO ☐ Data: _____ Período: _____
 BOLSA: ☒ SIM ☐ NÃO ☐ PERÍODO (em meses): 2017 a mar/2019
 ÓRGÃO FINANCIADOR: CAPES Carga Horária: 120H
 ESTÁGIO DOCÊNCIA: ☒ SIM ☐ NÃO ☐

OUTRAS EXIGÊNCIAS REGIMENTAIS

SUBMISSÃO DE ARTIGOS: ☒ SIM ☐ NÃO ☐ Quantidade: _____
 PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS: ☐ SIM ☒ NÃO ☐ Quantidade: _____
 APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM EVENTOS: ☐ SIM ☒ NÃO ☐ Quantidade: _____
 OUTRAS EXIGÊNCIAS REGIMENTAIS: ☐ SIM ☒ NÃO ☐ Quantidade: _____

EM: 11/11

Mar. 11/11
 Assinatura do(a) Coordenador(a) do Curso
 SIAPE 1132902

Posneuro
 Coordenador(a) do Curso
 Profª Sandra Lopes de Souza
 Coordenadora