



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

KÁSSIA DE OLIVEIRA GOMES DA SILVA

REPERCUSSÕES DO TRATAMENTO NEONATAL COM ÁCIDO FÓLICO NA
PARALISIA CEREBRAL: Um estudo experimental

Recife

2019

KÁSSIA DE OLIVEIRA GOMES DA SILVA

**REPERCUSSÕES DO TRATAMENTO NEONATAL COM ÁCIDO FÓLICO NA
PARALISIA CEREBRAL: Um estudo experimental**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Área de Concentração: Neurociência.

Orientadora: Prof^a Dra^a Ana Elisa Toscano

RECIFE

2019

S586r Silva, Kássia de Oliveira Gomes da.
Repercussões do tratamento neonatal com ácido fólico na paralisia cerebral: um estudo experimental / Kássia de Oliveira Gomes da Silva. – 2019.
99 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Ana Elisa Toscano.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2019.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Asfixia. 2. Paralisia cerebral. 3. Ácido fólico. 4. Reflexo. 5. Córtex motor. I. Toscano, Ana Elisa (Orientadora). II. Título.

616.8 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2019-265)

KÁSSIA DE OLIVEIRA GOMES DA SILVA

**REPERCUSSÕES DO TRATAMENTO NEONATAL COM ÁCIDO FÓLICO NA
PARALISIA CEREBRAL: Um estudo experimental**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Neurociências.

Aprovada em: 31/10/2019.

BANCA EXAMINADORA:

Profª Drª Sandra Lopes de Souza (Membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª Drª Kelli Nogueira Ferraz Pereira Althoff (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª Drª Matilde Cesiana da Silva (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Diego Cabral Lacerda (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Drª Julliet Araújo de Souza (Membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho: Aos meus pais, **Cláudia e João**, minha base e a quem devo muito da minha vida; Ao meu esposo, **Luciano**, minha companhia, força e inspiração diária; À minha filha, **Karina**, minha maior fortaleza para conseguir concluir esta etapa.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por ter me abençoado tanto durante esta jornada. Foi difícil a caminhada, mas sou extremamente grata a Ele por nunca ter me abandonado e, apesar das minhas falhas, mostrar sempre sua presença na minha vida. Me mudar para uma cidade a pouco mais de 800 km de distância de Recife, praticamente recém-casada e no início do doutorado para realizar um sonho, foi uma decisão difícil e que me trouxe muitas noites adormecendo em meio a lágrimas, mas acordando fortalecida a cada amanhecer, na certeza de que fiz a escolha certa e que tudo iria melhorar.

Ao meu esposo, Luciano, quem sofreu comigo todas as consequências da minha escolha, mas que foi minha calmaria no meio da turbulência e meu apoio constante. Sempre foi por nós, apesar do sonho ser meu. Obrigada por ter sido presente na ausência, ser força na fraqueza, ser amor e doação sempre. Obrigada pelos conselhos, por abrir meus olhos quando eu nem percebia fechá-los, por respirar fundo e pensar junto comigo (ou por mim, quando o desespero batia a porta).

À minha família (mãe, pai, avós, irmão, sogros), por serem uma base forte na qual eu pude e posso crescer como pessoa e profissional. Obrigada por também segurarem minhas mãos e caminharem junto comigo sempre. Meus pais, Cláudia e João, e meus sogros, Amélia e Leuvino, que se preocupavam comigo a todo momento, choravam comigo a cada despedida e sorriam a cada encontro. Como sou feliz por tê-los na minha vida! Como sou feliz pela família que Deus me deu!

À minha orientadora, Ana Elisa, por ter sempre muita paciência e confiança diante da minha calmaria aparente e constante (mas por dentro eu estava numa loucura de vida e de pensamentos) e por ter me ajudado a voltar “pro meu aconchego”, realizando o segundo sonho dessa jornada! Perdão pelas minhas falhas, que sei que foram muitas. Lidar com minha teimosia não deve ser fácil...

Aos amigos do laboratório, por ouvirem os desabafos em diversos momentos. Em especial gostaria MUITO de agradecer a Henrique por ter sido um apoio fundamental desde a minha volta. Não nos conhecíamos, mas não foram medidos esforços para me ajudar sempre que precisei, com experimentos, dicas,

empréstimos. Também agradeço bastante a Diego Lacerda, que mesmo distante sempre me ouvia e foi presente quando era preciso. Podem contar comigo SEMPRE!

Aos amigos que Deus colocou em minha vida (aqui o parágrafo vai ser longo! Na verdade, dividido em três). Amigas de colégio (Ah, Liceu de Artes e Ofícios ♥) e de graduação, de tempos “roupanovísticos”, de cursinhos, de todos os cantinhos por onde passei, que também foram presentes na ausência e em nada mudou a amizade que nutrimos reciprocamente. Aos amigos que Picos me deixou de presente (vizinhas, colegas de trabalho e alunos), especialmente Kamilla e Suzane. Chegar em uma cidade totalmente desconhecida, entender o funcionamento da nova Universidade e saber para onde ir na cidade foi um grande susto e desafio, mas ter alguém para passar o tempo e esvaziar a mente (tão cheia de dúvidas, medos e saudade) foi fundamental. Obrigada mesmo! Sempre me ajudaram e também pude compartilhar um pouco da minha vida, tornando-se amigas especiais (espero as visitas aqui!).

Aos meus alunos, que não cabe escrever o nome de cada um aqui (mas guardo-os num cantinho muito especial da memória e do coração), que compartilhavam comigo da mesma saudade de casa e da família. Sempre conversávamos sobre o quanto era difícil, mas que valeria a pena passar por tudo isso em busca de um objetivo, e que tudo um dia acabaria, sairíamos vencedores. Tenho tanto orgulho de vocês! Continuem! Não desistam!

Aos colegas de trabalho do Departamento de Anatomia/UFPE, em especial a Renata Campina, Fernanda Villarouco e Sandra Lopes, que me aguentaram perguntando o tempo todo sobre a minha possível transferência e volta para o meu cantinho de sempre. MUITO OBRIGADA por terem sido não só ouvidos, mas ações. MUITO OBRIGADA por me ajudarem a conquistar meu espaço no Departamento e voltar ao lugar que me sinto pertencente desde o primeiro dia de graduação. Estar aqui como docente é um presente (é estressante também, a gente sabe, mas fazer o que ama acaba compensando no final). Das três, ainda gostaria de destacar a importância da prof. Sandra na minha vida. Obrigada por sempre me ouvir, aconselhar, ajudar nessa estrada árdua da vida acadêmica. Perdão por minhas falhas, por também estar distante em diversos momentos, mas sempre a levo em meus pensamentos e orações, não tenha dúvidas.

Agradeço também àqueles que me socorreram em diversas etapas do doutorado. Viviane, que sempre esteve disponível quando eu precisava de protocolos ou auxílio na metodologia; Anderson e prof. Beth Neves, pelo empréstimo do microscópio para as análises e pelo tempo disponibilizado para que pudéssemos concluir este passo; Prof. Simone Marcuzzo (em Portugal) e Prof. Yves (na França), que mesmo distantes e sem me conhecer pessoalmente não se recusaram a tirar minhas dúvidas (com bastante paciência) quanto às metodologias empregadas nos artigos e o uso dos programas de computador para realizar as análises corretamente.

Aos meus estagiários, que toparam enfrentar esse trabalho junto comigo: Ewerton, que chegou desde o meu retorno à Recife e foi minhas duas mãos nos experimentos. Se não fosse você, não sei como conseguiria cumprir com todas as obrigações de docente desta Universidade e ainda fazer todos os experimentos nos horários corretos. Você foi uma bênção divina, rapaz! Marília e Nathália, que chegaram mais no finalzinho dos experimentos, mas que também me ajudaram bastante a concluir as análises. Espero que todos tenham aprendido algo acadêmico e para a vida neste período que passamos juntos.

Minha bebezinha, que por enquanto está “no forninho” e chegou no final desta jornada, mas que já é importantíssima e fundamental para a conclusão de tudo. Minha Karina, obrigada por já ser parte de mim, por chegar na hora certa, por ser a resposta de Deus às minhas orações. Tudo que vivi até hoje foi para chegar neste momento e dizer, com toda a certeza: FOI POR VOCÊ! Foi para que, ao saber da sua existência, saber também que fiz o meu melhor para que você venha com tudo o que planejei para este momento. EU TE AMO, minha filha!

Por fim, agradeço de forma geral a todos que não foram citados de forma específica, mas que contribuíram para formar quem eu sou hoje. Eu não teria conseguido nada sozinha. Obrigada!

A todos vocês, lutem pelos seus objetivos, por mais difícil e surreal que possa parecer chegar ou manter-se nele. Posso dizer SIM que sou EXTREMAMENTE abençoada (e, talvez, sortuda também) por ter chegado onde cheguei até mais rápido que outros, mas JAMAIS poderia dizer que foi fácil nem que me arrependo de algo. Todas as dificuldades me fizeram perceber o quanto tem gente que está ao

meu lado, o quanto sou forte para suportar situações que nunca pensei passar ou aguentar, o quanto Deus me ama e está comigo. E estou aqui, torcendo por cada um e ajudando sempre que estiver ao meu alcance. Conseguiremos todos chegar ao nosso objetivo se continuarmos em busca dele.

Preste atenção, não abra mão dos próprios sonhos! Não tem perdão. Não deixe de sonhar, não deixe de sorrir, pois não vai encontrar quem vai sorrir por ti (PANASSOLO, 2007).

RESUMO

A paralisia cerebral (PC) é um distúrbio neurológico não progressivo ocorrido durante o desenvolvimento cerebral, que modifica as funções motoras e retarda o crescimento somático e a maturação dos reflexos. Tem uma prevalência global de 2,1 crianças a cada mil nascidos vivos, sendo maior nos países subdesenvolvidos. Comumente crianças com PC apresentam desnutrição, e o ácido fólico, uma vitamina que faz parte do complexo B, atua em várias reações fisiológicas, incluindo a formação de novas células, a formação de neurotransmissores e a síntese e reparo da mielina. O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da suplementação pós-natal de ácido fólico sobre a maturação somática, ontogênese dos reflexos e morfologia cortical de ratos submetidos ao modelo experimental de paralisia cerebral. O estudo experimental utilizou 63 ratos machos Wistar distribuídos entre os seguintes grupos: Controle Salina (n=14), Controle Ácido Fólico (n=15), Paralisia Cerebral Salina (n=17), Paralisia Cerebral Ácido Fólico (n=17). A suplementação com ácido fólico foi realizada do primeiro ao 21º dia pós-natal, por via subcutânea no dorso do animal, utilizando uma dose de 5 mg/kg de peso corporal. Animais salina receberam solução de Cloreto de Sódio (NaCl) a 0,9% também subcutaneamente. A quantidade aplicada de salina/ácido fólico foi de 10 µl/g de peso corporal. O crescimento somático foi avaliado no 1º dia e a partir do 3º dia foi reavaliado com intervalo de 3 dias até o 21º dia. A maturação das características físicas e a ontogênese dos reflexos foram avaliadas diariamente até sua completa maturação. No 29º dia, os animais foram eutanasiados e o encéfalo removido para análise histológica dos córtices S1 e M1. A comparação das médias foi realizada pelos testes ANOVA Two Way e Kruskal-Wallis e $p < 0,05$. A paralisia cerebral, comparando com animais controle, reduziu o peso corporal e o crescimento somático, bem como causou a abertura tardia do canal auditivo e dos olhos e atraso nos reflexos de queda livre, geotaxia negativa e resposta ao susto, sem a influência da suplementação de ácido fólico em qualquer um destes parâmetros analisados. No entanto, em animais com paralisia cerebral, a suplementação com ácido fólico aumentou o número de células gliais no córtex S1 e no córtex M1 houve aumento do número de neurônios e células gliais comparando com animais com PC não suplementados. Os dados sugerem que a suplementação de ácido fólico no período

pós-natal, na paralisia cerebral experimental, parece exercer mais efeitos após o período de lactação, aumentando o número de neurônios e/ou células gliais na análise histológica do córtex cerebral, correspondendo ao período de melhoria e maturação dos circuitos neurais nestes animais.

Palavras-chave: Asfixia. Paralisia cerebral. Ácido fólico. Reflexo. Córtex motor.

ABSTRACT

Cerebral palsy (CP) is a non-progressive neurological disorder occurred during brain development that modifies motor functions and delays somatic growth and maturation of reflexes. It has a global prevalence of 2.1 children per thousand live births, being higher in underdeveloped countries. Children with CP often exhibit malnutrition, and Folic acid, a vitamin that is part of the B complex, acts on various physiological reactions, including the formation of new cells, the formation of neurotransmitters, and synthesis and repair of myelin. The objective of the study was to evaluate the effects of post-natal folic acid supplementation on somatic maturation, reflex ontogenesis and cortical morphology of rats submitted to the experimental model of cerebral palsy. The experimental study consisted of 63 male Wistar rats distributed among the following groups: Control Saline (n=14), Control Folic Acid (n=15), Cerebral Palsy (n=17), Cerebral Palsy Folic Acid (n=17). Folic acid supplementation was performed from the first to the 21st day, subcutaneously on the back of the animal using a dose of 5 mg/kg body weight. Saline animals received 0.9% Sodium Chloride (NaCl) solution also subcutaneously. The amount of Saline/Folic Acid applied was 10 µl/g body weight. Somatic growth was evaluated on the 1st day and from the 3rd day it was reevaluated with an interval of 3 days until the 21st day. The maturation of the physical characteristics and the ontogenesis of reflexes were evaluated daily until their complete appearance. On the 29th day, the animals were euthanized and the brain was removed for histological analysis of the S1 and M1 cortices. The comparison of means was performed by ANOVA Two Way and Kruskal-Wallis tests and $p < 0,05$. Cerebral palsy, compared with control animals, reduced body weight and somatic growth, as well as caused the delayed opening of the ear canal, opening of the eyes and delayed reflexes of free-fall righting, negative geotaxis and auditory startle, without the influence of folic acid supplementation in any one of the parameters. However, in individuals with cerebral palsy, folic acid supplementation increased the number of glial cells in the S1 cortex, and in M1 cortex folic acid supplementation increased the number of neurons and glial cells, compared with not supplemented CP animals. The data suggest that supplementation of folic acid in the postnatal period in experimental cerebral palsy seems to exert more effects after the lactation period, increasing the number of

neurons and/or glial cells in the histological analysis of the cerebral cortex, corresponding to the period of improvement and maturation of neural circuits in these animals.

Keywords: Asphyxia. Cerebral Palsy. Folic acid. Reflex. Motor Cortex.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	NEUROPLASTICIDADE, DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO E DOS REFLEXOS.....	20
2.2	FOLATO/ÁCIDO FÓLICO E SISTEMA NEURO-MÚSCULO-ESQUELÉTICO	25
2.3	PARALISIA CEREBRAL	32
2.3.1	Paralisia Cerebral em Humanos.....	32
2.3.2	Paralisia Cerebral Experimental	36
3	HIPÓTESE.....	40
4	OBJETIVOS	41
4.1	GERAL.....	41
4.2	ESPECÍFICOS	41
5	MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1	ANIMAIS	42
5.2	FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	42
5.3	MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL	43
5.4	DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO E MATURAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS.....	45
5.5	ONTOGÊNESE DOS REFLEXOS.....	47
5.6	PERFUSÃO TRANSCARDÍACA E RETIRADA DO ENCÉFALO	50
5.7	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO CÓRTEX MOTOR.....	51
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
6	RESULTADOS	53
6.1	ARTIGO 1 – NEONATAL TREATMENT WITH FOLIC ACID INCREASES THE NUMBER OF NEURAL CELLS OF SPECIFIC CORTEX AREAS IN RAT MODEL OF CEREBRAL PALSY	53

6.2	ARTIGO 2 – ALTERAÇÕES NEUROANATÔMICAS OBSERVADAS ATRAVÉS DE IMAGENS POR TENSORES DE DIFUSÃO NA PARALISIA CEREBRAL ESPÁSTICA DIPLÉGICA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA	53
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A – ARTIGO EM PROCESSO DE PUBLICAÇÃO NA REVISTA EXPERIMENTAL NEUROLOGY	78
	ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO ORIGINAL.	98
	ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	99

1 INTRODUÇÃO

A Paralisia Cerebral (PC) é uma síndrome complexa, considerada a causa mais comum de perturbação motora crônica na infância. Ela prejudica funções importantes, causando limitação das atividades de vida diária e dependência funcional (BAX et al., 2005; ROSENBAUM et al., 2007; COLVER et al., 2014). Os sintomas comuns na PC incluem anormalidades no tônus muscular, na postura e na função motora, alterações de percepção, sensibilidade, comunicação, cognição, comportamento e deformações musculoesqueléticas (ROSENBAUM et al., 2007; PERENC et al., 2015).

A PC pode acontecer desde a gestação até os primeiros anos de vida, devido a lesões cerebrais que ocorrem durante o desenvolvimento deste órgão (CHAN E MILLER, 2014). Estes períodos sensíveis e específicos do desenvolvimento do sistema nervoso são chamados de períodos críticos, pois ocorrem alterações estruturais e funcionais importantes para o amadurecimento e desenvolvimento correto dos circuitos cerebrais (DOBBING, 1970; MORGANE et al., 1993; SENGPIEL, 2007; HENSCH AND BILIMORIA, 2012; TUCKER et al., 2015).

A plasticidade neuronal corresponde à habilidade do sistema nervoso tem em modificar-se morfofisiologicamente e expressar diferentes fenótipos devido experiências individuais e pela influência do ambiente (STEARNS et al., 1991; KOLB et al., 2003; GLUCKMAN et al., 2005). Ocorre de maneira fisiológica a todo momento, mas também pode ser induzida por diferentes situações, como fatores nutricionais a administração de drogas e o estresse. (MORGANE et al., 1993; GLUCKMAN et al., 2005). O folato (ou ácido fólico) é uma vitamina do complexo B essencial em todas as idades. Atua como cofator de diversas reações fisiológicas, com papel importante na síntese, no reparo e na metilação do DNA intracelular (NASSER et al., 2005; MILLER, 2008; CRIDER et al., 2012).

No sistema nervoso, o folato contribui na formação de novas células e novos tecidos, regula a expressão gênica, relaciona-se com a biossíntese e metabolismo de aminoácidos, nucleotídeos, neurotransmissores, reparação da mielina, formação

de hemácias e saúde cardiovascular (MILLER, 2008; VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010; BURDGE E LILLYCROP, 2012; REYNOLDS, 2014; HWANG et al., 2019). Sua deficiência é bastante relacionada com defeitos na formação do tubo neural e doenças cardíacas congênitas. No músculo esquelético, o folato é estudado como possível tratamentos para a sarcopenia e promoção da miogênese (MIYATA et al., 2015; WEE, 2016; HWANG et al., 2019).

Vários pesquisadores (STRATA et al., 2004; LUBICS et al., 2005; ROBINSON et al., 2005; BALASUBRAMANIAM et al., 2006; WANG et al., 2006; COQ et al., 2008; SAADANI-MAKKI et al., 2008; CHUA et al., 2009; ITO, 2010; KANNAN et al., 2011; LEKIC et al., 2011; STIGGER et al., 2011; TAKADA et al., 2011; HU et al., 2013; ROUSSET et al., 2013; MUKAI et al., 2017; KUMAR et al., 2019) procuram reproduzir um fenótipo semelhante à Paralisia Cerebral Humana utilizando modelos animais. Dentre os modelos existentes, os pesquisadores provocaram inflamação (através da injeção materna de lipopolissacarídeo), hemorragia intracraniana, hipóxia-isquemia associada à oclusão arterial, anóxia e/ou imobilização/desuso dos membros posteriores (restrição sensório-motora).

O modelo aplicado neste estudo associa a anóxia perinatal com a restrição sensório-motora, resultando em um fenótipo motor muito similar ao da PC humana. Como ponto principal da investigação, a PC experimental foi associada à suplementação de ácido fólico no período pós-natal. Diante disso, nós supomos, de forma original e inovadora, que a suplementação com ácido fólico em animais acometidos pela paralisia cerebral poderia ser capaz de modificar parâmetros comuns desta doença, promovendo melhora do desenvolvimento neuromotor. O objetivo foi avaliar os efeitos desta suplementação sobre o desenvolvimento somatossensorial/motor e morfologia cortical em ratos submetidos ao modelo experimental de paralisia cerebral

Nossa hipótese é que a suplementação de ácido fólico, quando aplicadas no período pós-natal, reverte os danos no desenvolvimento do sistema somatossensorial/motor e aumenta o número de células neurais no córtex de animais acometidos pela paralisia cerebral experimental. Assim, os dados

provenientes desse estudo podem contribuir com estratégias de tratamento dessa doença, tão comum no dia-a-dia de diversos profissionais da área da saúde.

Esta Tese faz parte de uma linha de pesquisa do Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (Departamento de Nutrição/LENIB – Recife) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), da Unidade de estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica – UFPE e do Laboratório de Exercício Físico e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória (CAV) – UFPE.

Os dados obtidos por este estudo resultaram em dois artigos:

1. Artigo original intitulado “Neonatal treatment with folic acid increases the number of neural cells of specific cortex areas in rat model of cerebral palsy”, submetido à Revista *Experimental Neurology*, conceito A1 para Medicina II.

2. Artigo de revisão sistemática, intitulado “Alterações neuroanatômicas observadas através de Imagens por tensores de Difusão na Paralisia Cerebral Espástica Díplégica: uma revisão sistemática”, a ser submetido à revista *NeuroImage: Clinical*, conceito A1 para Medicina II. Este artigo teve como objetivo reunir informações a respeito de regiões do sistema nervoso afetadas pela paralisia cerebral espástica díplégica utilizando a técnica de imagem por tensores de difusão. O tipo de paralisia cerebral considerada para esta revisão é semelhante ao produzido pelo modelo experimental, sendo dados complementares para reforçar as áreas a serem analisadas e auxiliar no processo de reabilitação dos pacientes.

O presente exemplar está estruturado da seguinte maneira:

1. Introdução
2. Revisão de Literatura
3. Hipótese
4. Objetivos
5. Materiais e Métodos
6. Resultados
7. Considerações Finais
8. Referências (do corpo da Dissertação)
9. Anexos

10. Apêndices

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEUROPLASTICIDADE, DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO E DOS REFLEXOS

Durante a formação de um indivíduo existem períodos considerados críticos para o desenvolvimento. Estes são momentos sensíveis e específicos da vida, onde o organismo sofre modificações morfofuncionais importantes e ocorrem eventos celulares como a neurogênese, angiogênese, gliogênese, migração e diferenciação celular (DOBBING, 1970; MORGANE et al., 1993). Estes períodos abrangem desde a fase gestacional até os primeiros anos de vida da criança, onde a experiência individual e o ambiente são essenciais para o amadurecimento e desenvolvimento adequado dos sistemas sensoriais e dos circuitos cerebrais (DOBBING, 1970; MORGANE et al., 1993; SENGPIEL, 2007; HENSCH AND BILIMORIA, 2012; TUCKER et al., 2015). Se não for estimulada, a função cerebral relacionada com os circuitos específicos será comprometida (HENSCH AND BILIMORIA, 2012).

Esses períodos críticos, em que o organismo está vulnerável a estímulos e mudanças, são considerados janelas do desenvolvimento. Esse conceito tem como base a consequência causada por algum estímulo precoce ao sistema nervoso (MORGANE et al., 2002). A habilidade que o sistema nervoso tem em alterar a sua organização e função e em expressar diferentes fenótipos, através de experiências individuais e pela influência do ambiente, é chamada de neuroplasticidade (STEARNS et al., 1991; KOLB et al., 2003; GLUCKMAN et al., 2005).

O desenvolvimento do sistema nervoso tem início na fecundação, sendo contínuo ao longo da vida. Alguns processos deste desenvolvimento encerram-se no período gestacional, porém outros são contínuos ainda no período pós-natal (RICE E BARONE, 2000). Algumas partes do cérebro, como o córtex cerebral, são potencialmente mais plásticas (KOLB et al., 2003). Este é formado por seis camadas celulares diferentes, que se especificam em neurônios ao atingirem seu local final. A maturação neuronal é orientada por sinais ambientais e conquistada com o crescimento axonal e dendrítico (KOLB E GIBB, 2011).

Em humanos, o processo ontogenético do sistema nervoso se inicia com a formação do tubo neural, em torno da 2ª a 3ª semana de gestação. Aproximadamente na 4ª semana de gestação o tubo neural se divide em três vesículas, que originarão o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo. Estas darão origem às estruturas anatômicas do encéfalo através de séries complexas, dinâmicas, sequenciais e temporalmente sobrepostas de eventos celulares, determinados geneticamente, mas também influenciados ambientalmente (LIU E RAO, 2004; TAU E PETERSON, 2010). Entre a 5ª a 6ª semana de gestação há proliferação de neuroblastos (precussores neuronais), que se diferenciam em células neuronais específicas a partir da 8ª semana de gestação. Esta última semana marca o início da neurogênese e a formação da estrutura laminar do córtex cerebral. A estrutura laminar é bastante complexa, com uma diversidade de neurônios e rica conectividade (LIU E RAO, 2004; BYSTRON et al., 2008; TAU E PETERSON, 2010).

A maioria dos neurônios pós-mitóticos utilizam as células gliais radiais como guias no caminho do neurônio até o seu destino final. A migração neuronal depende de um conjunto específico de interações moleculares entre ambos, ocorrendo o pico da migração neuronal entre a 12ª e a 20ª semana de gestação, estando completa até a 29ª semana (TAU E PETERSON, 2010). Estas células gliais radiais correspondem a células morfologicamente bipolares, cujo corpo celular localiza-se na zona ventricular e seus processos celulares bipolares se estendem da superfície ventricular até a superfície pial do cérebro fetal (TAU E PETERSON, 2010; STIPURSKY et al., 2011). Possuem natureza glial (BYSTRON et al., 2008) e geram a maioria dos neurônios e células da glia do córtex em desenvolvimento (TAU E PETERSON, 2010; STIPURSKY et al., 2011; ALLEN E LYONS, 2018). As células gliais radiais também dão suporte à migração neuronal de forma laminar, ou seja, auxiliam na formação das camadas corticais (STIPURSKY et al., 2011; ALLEN E LYONS, 2018).

Além das células gliais radiais, outros tipos de células da glia contribuem com o desenvolvimento do sistema nervoso, sendo conhecidas como astrócitos, oligodendrócitos e micróglia (ALLEN E LYONS, 2018). Os astrócitos interagem com todos os tipos de células do sistema nervoso central (SNC), sendo considerados células-tronco neurais no cérebro adulto (STIPURSKY et al., 2011; ALLEN E LYONS, 2018); os oligodendrócitos fornecem suporte metabólico aos axônios e

formam a bainha de mielina, acelerando o impulso nervoso, sendo a mielinização contínua até os estágios tardios pós-natais (LIU E RAO, 2004); e a micróglia, também conhecidos como macrófagos cerebrais (mas que possuem papéis cada vez mais evidentes nos diferentes estágios do desenvolvimento do sistema nervoso) (ALLEN E LYONS, 2018). As células da micróglia conduzem a sobrevivência neuronal, fagocitam os neurônios que sofreram apoptose durante os estágios iniciais do desenvolvimento (e também no cérebro adulto) e aprimoram a formação e a função do sistema nervoso (ALLEN E LYONS, 2018). Todos esses tipos de glia também guiam os axônios ao seu destino final (ALLEN E LYONS, 2018).

Após a finalização da neurogênese, migração neuronal e orientação do axônio, inicia-se a formação das sinapses em neurônios adjacentes, envolvendo diversos estágios. A glia desempenha papéis fundamentais em cada um deles, sendo um componente funcional das sinapses, promovendo o amadurecimento, fortalecimento, estabilização e manutenção das mesmas, além do crescimento dendrítico (STIPURSKY et al., 2011; ALLEN E LYONS, 2018). Também regula negativamente a formação e a função das sinapses quando necessário, eliminando sinapses fracas ou inadequadas no período final da sinaptogênese (ALLEN E LYONS, 2018).

Com as sinapses estabelecidas, a glia tem papel na regulação da captação de neurotransmissores, podendo modificar a concentração do neurotransmissor disponível na fenda sináptica. Este papel tem fundamental importância na plasticidade neuronal e na recuperação de lesões neurológicas (ALLEN E LYONS, 2018). Os astrócitos podem modular a excitabilidade neuronal e a transmissão da sinapse, ativando receptores pré e pós-sinápticos, a curto e a longo prazo (como mecanismo de memória e aprendizado a nível celular) (PEREA E ARAQUE, 2010). A plasticidade sináptica (a base do mecanismo de aprendizado e memória celular), focada, normalmente, apenas em alterações de elementos neuronais, também envolve a participação de astrócitos como elementos ativos e dinâmicos. Tal fato constitui uma unidade astrócito-sinapse, formando assim um conceito de sinapse tripartida, na qual a sinapse é constituída elementos pré e pós-sinápticos e os astrócitos adjacentes. (PEREA E ARAQUE, 2010).

Assim, a formação e a função do sistema nervoso são sustentadas por interações bidirecionais entre os neurônios e as células da glia. Dessa forma, a glia

pode regular o número de neurônios, mas os neurônios também podem influenciar no número de células gliais, como a proliferação de oligodendrócitos (e, consequentemente, de mielina) a partir da atividade neuronal, ou a migração de células da micróglia a através da morte celular programada de alguns neurônios (STIPURSKY et al., 2011; ALLEN E LYONS, 2018). Por muito tempo foi descrito que a proporção de células da glia e neurônios no cérebro humano correspondia a 10:1, porém hoje sabe-se que há uma proporção média igual entre ambos (ALLEN E LYONS, 2018).

O sistema nervoso, por meio de receptores sensíveis aos variados estímulos recebidos, atua em conjunto com o sistema musculoesquelético na interação entre o ser vivo e o meio ambiente (BERG, 1994). O reflexo, resposta motora repetitiva e automática mediante estímulos, é uma maneira utilizada para avaliação da integridade e do desenvolvimento do sistema nervoso (ZEHR e STEIN, 1999; NGUYEN et al., 2017), assim como é uma importante função reguladora da locomoção (ZEHR E STEIN, 1999). Ele surge em períodos determinados durante o desenvolvimento (FOX, 1965; SMART E DOBBING, 1971; RICE E BARONE, 2000) e age de forma inconsciente, sendo um mecanismo de proteção e/ou sobrevivência (SWERDLOW E GEYER, 1998).

Há uma íntima correlação entre o desenvolvimento do sistema nervoso e a ontogênese dos reflexos (ADLARD E DOBBING, 1971). No contexto geral, a maturação destes é considerada um indicador da maturação de diferentes regiões do SNC (KUPERMAN, 2013). A formação de conexões corticais superiores, através da mielinização, migração neuronal e sinaptogênese, promovem o controle voluntário sobre os reflexos. Alterações na evolução normal do sistema nervoso podem comprometer o desenvolvimento cerebral e, consequentemente, provocar atrasos ou ausências da maturação dos reflexos (NGUYEN et al., 2017).

O desenvolvimento dos reflexos segue uma sequência preestabelecida, mas sobrepõem-se uns aos outros de acordo com a ocorrência dos eventos de desenvolvimento do sistema nervoso (FOX, 1965; SMART E DOBBING, 1971; GRAMSBERGEN, 1998). Algumas respostas reflexas continuam durante o período de crescimento rápido do encéfalo ou podem sofrer modificações, adquirindo padrões comportamentais do adulto. Alguns, chamados de reflexos primitivos (como

o de preensão palmar), estão presentes no nascimento e desaparecem com o tempo (ADLARD E DOBBING, 1971), mas em sua maioria, os reflexos são inexistentes ao nascimento e adquiridos ao longo do desenvolvimento.

Reflexos observados em estudos com animais podem ser comparáveis ao desenvolvimento dos reflexos observados em humanos. Modelos animais que demonstrem anormalidades no desenvolvimento do sistema nervoso, como a paralisia cerebral experimental, frequentemente exibem reflexos atípicos assim como os observados em humanos com a mesma condição (NGUYEN et al., 2017). Nesse contexto, a avaliação neuronal em modelos animais pode ser investigada através de testes de reflexos sensório-motores, durante todo o período de lactação (FOX, 1965).

Ratos recém-nascidos possuem nível de maturação cerebral equivalente a um cérebro humano de aproximadamente 23 a 28 semanas de gestação. Atingem o desenvolvimento semelhante a um humano a termo por volta do 7º e o 10º dia de vida pós-natal (SEMPLE et al., 2013; NGUYEN et al., 2017). Enquanto a mielinização em humanos acontece ainda no útero, em ratos este evento ocorre por volta do 7º e o 10º dia de vida pós-natal, sendo o cérebro do rato recém-nascido totalmente desmielinizado (NGUYEN et al., 2017). Assim, avaliar os reflexos em ratos recém-nascidos fornece um momento apropriado para registrar a ontogenia e até mesmo uma descontinuidade do desenvolvimento cerebral (NGUYEN et al., 2017).

Durante a primeira semana após o nascimento, o animal permanece com a superfície ventral do corpo em contato com o chão. Rastejam-se apenas com as patas anteriores, mantendo as posteriores em extensão. Este padrão pode permanecer até a metade da segunda semana de vida pós-natal (WESTERGA E GRAMSBERGEN, 1993; JAMON E CLARAC 1998). A partir do 8º dia até aproximadamente o 11º dia pós-natal o rato pode se apoiar sobre as quatro patas e executar poucos passos, aumentando consideravelmente sua capacidade exploratória devido à rápida maturação nesse período (WESTERGA E GRAMSBERGEN, 1993). Por volta dos 14 dias acontecem os primeiros movimentos verticais, com visíveis movimentos de cabeça e ativação da musculatura dos membros posteriores e do tronco (WESTERGA E GRAMSBERGEN, 1993; JAMON

E CLARAC 1998). Até os 21 dias a coordenação e ativação da musculatura é aprimorada para o desenvolvimento de movimentos mais complexos. Ao completar as duas primeiras semanas de vida pós-natal o rato já possui padrão de marcha como um animal adulto, porém esse padrão ainda é passível de ajustes no decorrer do tempo. (WESTERGA E GRAMSBERGEN, 1993; JAMON E CLARAC 1998).

Em suma, no período de lactação, que vai do nascimento aos 21 dias de vida pós-natal no rato, ocorre a maturação e o desenvolvimento de padrões importantes para a locomoção (WESTERGA E GRAMSBERGEN, 1993). Neste período acontecem mudanças devido à plasticidade do sistema nervoso e, sendo um período crítico do desenvolvimento, qualquer intervenção pode influenciar a sequência do desenvolvimento destes animais (DEIRÓ et al., 2004; BARROS et al., 2004). A plasticidade neuronal pode ser induzida por diferentes situações, como administração de drogas, doenças, estresse, fatores genéticos e ambientais e pela nutrição (MORGANE et al., 1993; GLUCKMAN et al., 2005).

2.2 FOLATO/ÁCIDO FÓLICO E SISTEMA NEURO-MÚSCULO-ESQUELÉTICO

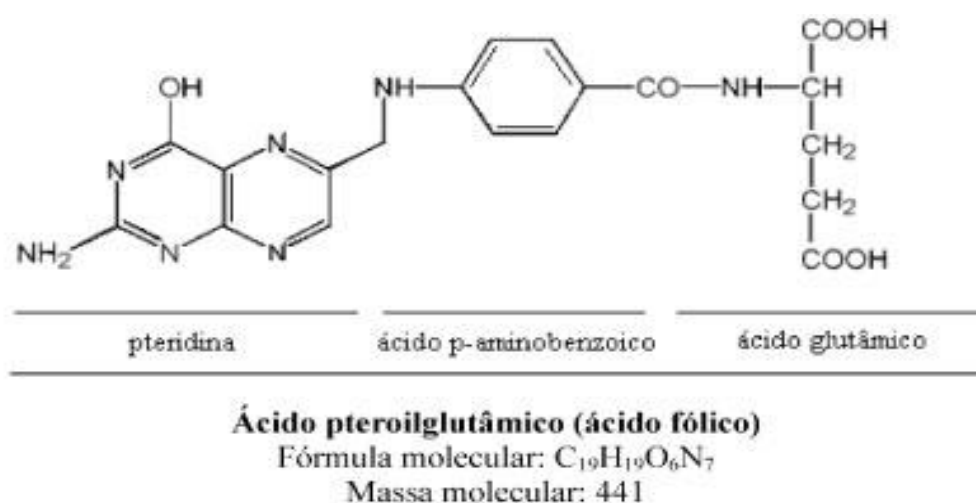
O folato é um micronutriente essencial e faz parte das vitaminas do complexo B. É hidrossolúvel e facilmente encontrado em vegetais verdes, legumes, fígado, peixes, frutas cítricas, maçã, melão, alimentos integrais, feijão, ervilhas, grão de bico e lentilhas, abacate, aspargos, gema de ovo, amendoim, beterraba crua, sementes e nozes (NASSER et al., 2005; MILLER, 2008; CRIDER et al., 2012). A importância desta vitamina foi descoberta há cerca de 80 anos, quando foi percebido que a anemia gestacional poderia ser tratada com o uso de extrato de levedura. Deste extrato foi descoberto o folato, que mais tarde foi também identificado nas folhas de espinafre e dele extraído. Em seguida foi iniciada a elaboração da forma sintética desta vitamina a fim de utilizar no tratamento de doenças derivadas da carência do folato (RIBEIRO et al., 2002; NASSER et al., 2005).

Os termos folato e ácido fólico em geral podem ser considerados sinônimos

mas existe uma pequena diferença entre eles. O nome folato normalmente é utilizado para indicar poliglutamatos (formas ativas da vitamina) que são encontrados naturalmente nos alimentos, sendo um composto em que há a presença do ácido pteróico conjugado a pelo menos um resíduo de ácido L-glutâmico (VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010). Já o termo ácido fólico corresponde à forma sintética do folato, sendo muito utilizado como suplemento vitamínico e na fortificação de alimentos. Esta forma sintética possui poder de absorção maior (em torno de 95%) comparando com a sua forma natural (que tem 50% de poder de absorção) (MILLER, 2008; BURDGE E LILLYCROP, 2012; REYNOLDS, 2014).

O ácido fólico possui forma molecular $C_{19}H_{19}O_6N_7$ e corresponde à forma farmacêutica do ácido pteroilglutâmico, sendo considerado uma forma estável do folato mas não sendo ainda a forma metabolicamente ativa (VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010; MATTOS DELLA LUCIA et al., 2011) (Fig. 1). O Folato é convertido em sua forma ativa, 5-metiltetrahydrofolato (5-MTHF ou L-metilfolato) (TCHANTCHOU E SHEA, 2008), resultante do metabolismo final da vitamina no trato digestivo, porém a sua forma sintética, o ácido fólico, precisa ser convertida no fígado ou em outros tecidos posteriormente (VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010; PATANWALA et al., 2014; HWANG et al., 2019).

Figura 1 – Imagem ilustrativa da estrutura química do ácido fólico.



A nível celular, o folato atua como cofator de diversas reações fisiológicas através da transferência de carbonos (doação de radicais metílicos). Está relacionado com vários processos bioquímicos do crescimento e desenvolvimento, devido ao seu papel na síntese, no reparo, na metilação do DNA intracelular. Dessa forma, contribui com a formação de novas células e novos tecidos, regulando a expressão gênica. Também está relacionado com a biossíntese e metabolismo de aminoácidos (em especial a serina e a homocisteína, atuando juntamente com a cobalamina e o ácido ascórbico) e nucleotídeos, síntese de neurotransmissores e síntese e reparação da mielina, formação de hemácias e saúde cardiovascular. Sua deficiência está bastante relacionada com defeitos na formação do tubo neural, doenças cardíacas congênitas, osteoporose e câncer, por exemplo (MILLER, 2008; VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010; BURDGE E LILLYCROP, 2012; REYNOLDS, 2014; HWANG et al., 2019).

O folato é necessário para a síntese de metionina a partir da homocisteína (Hcy), um aminoácido neurotóxico derivado do metabolismo da própria metionina (BLACK, 2008). A forma ativa do ácido fólico, através da doação de seu grupo metil, participa da remetilação da Hcy, juntamente com as vitaminas B6 (piridoxina) e B12 (cobalamina). A Hcy remetilada gera a metionina (TCHANTCHOU E SHEA, 2008), que através da reação com ATP é convertida em S-adenosil-L-metionina (SAME). Este participa de diversas reações de metilação do corpo, como a metilação do DNA, síntese de mielina e formação de hormônios e neurotransmissores como serotonina, epinefrina e dopamina (SACHDEV, 2004; BLACK, 2008; MILLER, 2008; TCHANTCHOU E SHEA, 2008; VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010; CRIDER et al., 2012).

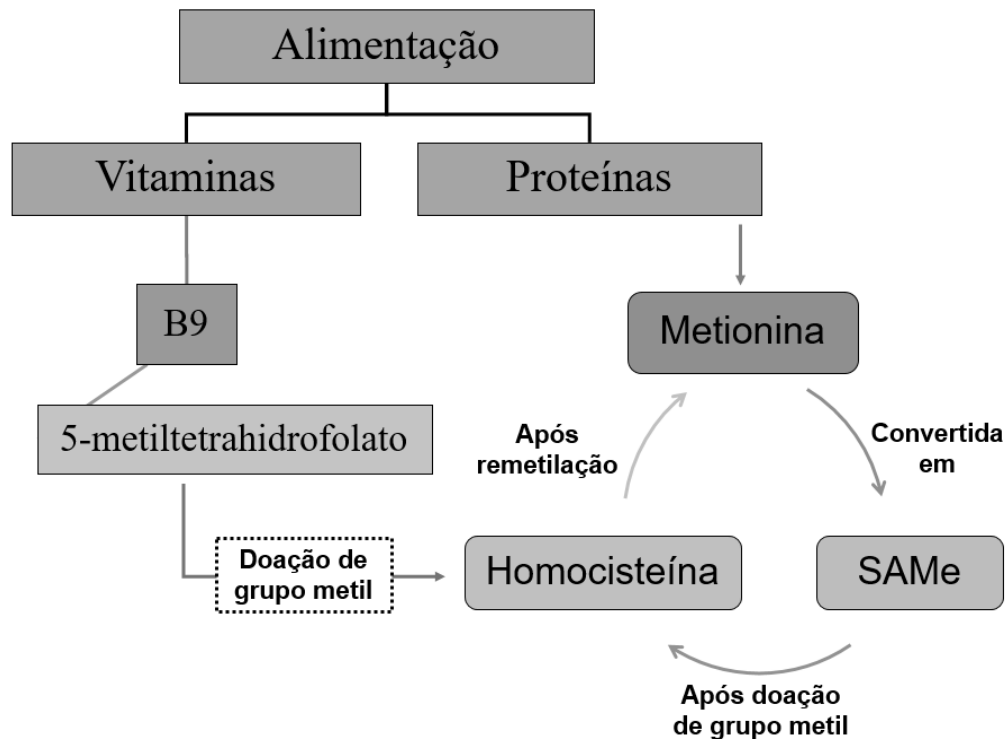
Na clínica, o uso do folato é utilizado para melhorar a eficácia dos antidepressivos, sobretudo, em não respondedores aos tratamentos convencionais, devido à sua ação nos neurotransmissores (PAPAKOSTAS et al., 2012; REYNOLDS, 2013). Neurotransmissores são também utilizados como sinais de desenvolvimento por conta da sua capacidade em modular a construção dos circuitos neurais e sua plasticidade (LIPTON E KARTER, 1989). A serotonina pode articular eventos do desenvolvimento, como divisão celular, migração neuronal, diferenciação das células e sinaptogênese, através de receptores com ações

diferenciadas durante períodos específicos da vida (AZMITIA, 2001; GASPAR et al., 2003).

Após a doação do grupo metil, o SAMe transforma-se em homocisteína, que pode sofrer remetilação e se tornar metionina novamente (SACHDEV, 2004; MILLER, 2008; TCHANTCHOU E SHEA, 2008) (Fig. 2). Na ausência ou redução dos níveis de folato, índices elevados de Hcy estão relacionados com índices menores de SAMe no plasma e líquido cefalorraquidiano. Esta condição está associada ao maior risco de lesão e doença cerebrovascular, como endurecimento dos vasos sanguíneos e aumento da pressão arterial e neurotoxicidade, gerando sintomas depressivos e comprometimento da síntese de DNA (SACHDEV, 2004; BLACK, 2008; MILLER, 2008; TCHANTCHOU E SHEA, 2008; VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010). No encéfalo, os mecanismos relacionados a esse processo incluem prejuízo da vasodilatação cerebral, inibição da enzima óxido nítrico-sintetase, promoção da peroxidação lipídica, prejuízo do potencial antioxidativo celular, aumento da agregação plaquetária, inibição dos anticoagulantes naturais, ativação da apoptose neuronal e aumento do estresse oxidativo (SACHDEV, 2004; MATTÉ et al., 2007; TCHANTCHOU E SHEA, 2008; DIBELLO et al, 2010; UEHARA E ROSA, 2010; KOOHPEYMA et al., 2019).

Assim, o ácido fólico tem papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central, na preservação e integridade da memória e no metabolismo de neurotransmissores. Sua participação neste último é, provavelmente, a maior responsável pela relação com o humor e a cognição (SACHDEV, 2004; MILLER, 2008; TCHANTCHOU E SHEA, 2008; DIBELLO et al, 2010; UEHARA E ROSA, 2010)

Figura 2 – Esquema simplificado do metabolismo da vitamina B9.



Esquema do metabolismo da vitamina B9 através da metilação da homocisteína. Fonte: Do autor.

Em relação ao músculo esquelético, não há relatos de medicamentos ou nutrientes aprovados, mas há estudos em andamento como possíveis tratamentos para a sarcopenia, incluindo estudos com ácido fólico (WEE, 2016). Estudos in vitro utilizaram células de mioblastos de murinos para verificar o efeito do ácido fólico na maturação e diferenciação destes. Tais estudos perceberam que a suplementação promoveu a formação de miotubos multinucleados e aumento do índice de atividade da creatina quinase e da expressão da cadeia pesada de miosina, dos MRFs (Fatores de Regulação Miogênica), MyoD (Diferenciação Miogênica 1) e Miogenina (MIYATA et al., 2015). Estes fatores regulam a miogênese e participam do processo de diferenciação celular (HWANG et al., 2019).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a necessidade diária de folato varia conforme a necessidade do organismo, estado fisiológico e os estágios de vida (ANVISA, 2005) (Tab. 1). Como padrão definido, o consumo diário de folato recomendado para um adulto é, em média, de 240 µg/dia

ou 3,1 µg/kg de peso corporal. Em estágios em que há aumento da taxa metabólica, da renovação celular, falhas na absorção ou ingestão alimentar insuficiente, utiliza-se a complementação/suplementação da sua forma farmacêutica, numa dose de 200 µg/dia a 500 µg/dia. A reposição desta vitamina pode ser administrada via oral, mas também por via endovenosa, intramuscular ou subcutânea (VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010).

Durante o período gestacional, relacionado com alta taxa metabólica pelo crescimento do embrião/feto, ocorre demanda nutricional maior de folato e assim é comum ocorrerem deficiências desta vitamina (BURDGE E LILLYCROP, 2012). Há uma relação entre deficiência de folato na gestação e ocorrência de pré-eclâmpsia, deslocamento prematuro da placenta, aborto espontâneo e malformações fetais (VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010). Estas malformações fetais são defeitos no fechamento do tubo neural devido a falhas no período de embriogênese. Correspondem à causa mais comum de malformações congênitas, que resulta em anencefalia fatal ou espinha bífida, com diversas variações de níveis, assim como lábio leporino e fenda palatina (VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010; BURDGE E LILLYCROP, 2012). Assim, para diminuir a incidência de defeitos na formação do tubo neural e garantir a manutenção da mielina nos neurônios do encéfalo, terapias de suplementação do ácido fólico são importantes e amplamente utilizadas neste período. O início da ingestão é recomendado, inclusive, pelo menos três meses antes da gestação (LEE et al., 2010; BURDGE E LILLYCROP, 2012; REYNOLDS, 2014; VALERA-GRAN et al., 2014).

Tabela 1 – Ingestão diária recomendada de ácido fólico (µg/dia), de acordo com a faixa etária.

Faixa etária	Lactentes		Crianças			Adolescentes e Adultos	Gestantes	Lactantes
	0-6 meses	7-11 meses	1-3 anos	4-6 anos	7-10 anos			
Quantidade (µg)	48	48	95	118	177	240	355	295

Fonte: ANVISA, 2015.

Deve-se manter a recomendação de suplementação padrão, sempre abaixo

de 5000 µg/d (normalmente em torno de 400 µg/d) para garantir os efeitos benéficos no desenvolvimento neuromotor da criança. Consequências nas crianças cujas mães foram expostas a altas doses (a partir de 5000 µg/d) de suplementação com ácido fólico durante a gestação ainda não estão totalmente claras (VALERA-GRAN et al., 2014). Alguns estudos evidenciam que a suplementação excessiva de ácido fólico pode ser associada à redução do peso corporal, do crescimento e do desenvolvimento psicomotor do feto, alterações no desenvolvimento cerebral, mudanças comportamentais (ansiedade, hiperatividade), risco de doenças respiratórias e de desenvolvimento de diabetes tipo 2 e alergias, embora ainda sejam resultados controversos ou até mesmo reversíveis com dieta pós-natal equilibrada (BURDGE E LILLYCROP, 2012; BARUA et al., 2014; VALERA-GRAN et al., 2014; HUOT et al., 2016).

Apesar de amplamente utilizado e ter sua importância durante a fase gestacional bastante conhecida e difundida, o ácido fólico é uma vitamina importante para o funcionamento e desenvolvimento do sistema nervoso em todas as idades, sendo necessária a ingestão de uma quantidade mínima também em neonatos, lactentes e crianças (VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010; REVAKOVA et al., 2015). Segundo a tabela 1 (ANVISA, 2015), durante o primeiro ano de vida, bebês necessitam de 48 µg de ácido fólico por dia, e esta necessidade vai aumentando a partir de 1 ano de idade conforme o desenvolvimento e faixa etária da criança. Em neonatos, crianças e adolescentes a deficiência de ácido fólico ou alterações no metabolismo do folato podem ocasionar retardo no desenvolvimento neurológico, alterações motoras e na marcha, alterações comportamentais, sinais de desmielinização e deterioração cognitiva (VANNUCCHI E MONTEIRO, 2010).

Diante disso, é observada uma importante interação sinérgica do folato com o sistema nervoso central. Problemas neurológicos poderiam, a princípio, ser tratados através da plasticidade cerebral (BUDHDEO E RAJAPAKSA, 2011). Perante essa evidência, é necessário compreender de que maneira intervenções precoces podem afetar ou contribuir para neuroplasticidade, além de fornecer informações relevantes na elaboração de estratégias terapêuticas inovadoras, visando minimizar os impactos de doenças neurológicas como a paralisia cerebral.

2.3 PARALISIA CEREBRAL

2.3.1 Paralisia Cerebral em Humanos

A Paralisia Cerebral (PC) é uma síndrome complexa, que compreende um grupo de alterações permanentes do movimento e da postura que causam limitação funcional devido a distúrbios que acontecem durante o desenvolvimento do sistema nervoso central do feto ou da criança (BAX et al., 2005; ROSENBAUM et al., 2007). É considerada a causa mais comum de disfunção motora crônica na infância (COLVER et al., 2014). A lesão neurológica é estática e não progressiva, porém os sinais clínicos apresentados são mutáveis em decorrência da maturação cerebral que acontece ao longo do tempo (CHAN E MILLER, 2014; STAVSKY et al., 2017). Como o desenvolvimento cerebral em humanos é contínuo e intenso até os primeiros anos de vida, lesões a este órgão podem ainda ocorrer até os 5 anos de idade, possibilitando o desenvolvimento da patologia (CHAN E MILLER, 2014).

Os fatores de risco para a Paralisia Cerebral são bastante variados. Podem estar associados a fatores ocorridos antes ou durante a gestação, no momento do nascimento e até mesmo nos primeiros anos de vida da criança. Pode, inclusive, ser o resultado de uma ou mais etiologias e, portanto, difícil determinar a causa exata na maioria dos indivíduos (JONES et al., 2007; STOKNES et al., 2011). Quanto mais fatores de risco estão associados, maior o risco de desenvolvimento da paralisia cerebral na criança (STOKNES et al., 2011). Em crianças nascidas a termo normalmente não há uma causa pré-natal ou única, o que provavelmente está relacionado com a vulnerabilidade individual a eventos adversos. Já a maioria das crianças prematuras possuem uma combinação de fatores de risco pré e perinatais (STOKNES et al., 2011).

Dentre os fatores pré-natais estão listados a idade gestacional e doenças maternas como epilepsia, alterações na tireoide, diabetes e fatores genéticos (STOKNES et al., 2011). Outros fatores, relacionados tanto à gestação quanto ao período perinatal, são gestações múltiplas, malformações congênitas, lesão da substância branca periventricular e leucomalácia periventricular, infecções, fumo,

processos patológicos intrauterinos, crescimento intrauterino restrito, hipertensão materna, pré-eclâmpsia, desnutrição, baixo peso ao nascer (menor que 2500 gramas), hemorragia intracraniana, prematuridade, traumas, aspiração de mecônio, dificuldades respiratórias e asfixia, que alteram o desenvolvimento cerebral do feto ou do recém-nascido. Fatores pós-natais mais comuns estão meningite bacteriana, encefalites virais, hiperbilirrubinemia e quedas (KOMAN et al., 2004; KRIGGER, 2006; JONES et al., 2007; HIMMELMANN et al., 2011; STOKNES et al., 2011; EUNSON, 2012; STREJA et al., 2013; MACLENNAN et al., 2015; STAVSKY et al., 2017). Cerca de 6% dos casos são por danos causados durante o parto, como asfixia (KRIGGER, 2006), que pode chegar a 20% dos casos de PC perinatal (COLVER et al., 2014).

A prevalência global da PC possui variações pequenas ao longo do tempo, mas se mantém sem alterações consistentes nos últimos 40 anos (BLAIR, 2010; COLVER et al., 2014). Afeta de 1,5 a até mais de 4 indivíduos a cada 1000 nascidos vivos, tendo uma prevalência global em média de 2,1 crianças a cada 1000 (OSKOUI et al., 2013; STAVSKY et al., 2013). Esta taxa pode ser ainda maior em países subdesenvolvidos ou em processo de desenvolvimento, onde os serviços de saúde são mais precários, reunindo condições ainda mais favoráveis ao desenvolvimento de problemas crônicos como a PC (HIMMELMANN, 2013; IBRAHIM E BHUTTA, 2013). Nestes, estima-se que a cada 1.000 crianças nascidas vivas, sete são portadoras de PC, e que há cerca de 30.000 a 40.000 novos casos por ano (MANCINI et al., 2002). A prevalência da paralisia cerebral no Brasil atualmente é desconhecida, mas acredita-se que seja alta devido à pouca assistência à saúde a gestantes e recém-nascidos, sendo em torno de 17 mil novos casos anualmente (ARAÚJO E LUCENA, 2012).

A forma de apresentação da doença é bastante complexa, possuindo diversas classificações (KOMAN et al., 2004). A classificação da PC de acordo com a distribuição topográfica dos danos motores ainda é difícil de ser diferenciada na prática clínica (REBEL et al., 2010; EUNSON, 2012). Sobre esta, a PC pode ser descrita geralmente como diplégica (comprometimento dos membros inferiores), hemiplégica (comprometimento de membro superior e inferior ipsilateral), e quadriplégica (quatro membros afetados gravemente) (EUNSON, 2012).

A doença pode ser também organizada de acordo com os sinais clínicos apresentados, como espasticidade, distonia, ataxia e discinesia, sendo esta ainda subdividida em coreia e atetóide (EUNSON, 2012). A espasticidade se caracteriza pela maior resistência dos membros a movimentos passivos e rápidos, sendo uma forma de PC hipertônica. Já as demais classificações caracterizam-se pela variação de tônus no estado de repouso e em situações de estresse, sendo formas de uma PC flutuante. A ataxia, embora tenha tônus muscular variável, também é dominada por hipotonia (REBEL et al., 2010; EUNSON, 2012).

A PC espástica geralmente é característica de alterações do trato piramidal, enquanto que a discinética, atáxica e atetóica estão relacionadas a lesões no trato extrapiramidal. A PC atáxica é, ainda, relacionada com lesões no cerebelo e/ou em vias a ele relacionadas (REBEL et al., 2010; EUNSON, 2012). Também podem estar envolvidas lesões nos núcleos da base, tálamo, tronco encefálico e córtex cerebral (SANGER et al., 2003; COLVER et al., 2014). Devido à possibilidade de afetar diversas estruturas do sistema nervoso, técnicas de neuroimagem vêm sendo utilizadas a fim de detectar danos em locais específicos e a extensão da lesão no paciente (ACCARDO et al., 2004). A Ressonância Magnética (RM) é amplamente utilizada nestes casos, sendo considerada a técnica padrão principalmente quando a etiologia da PC não é conhecida e por ser clinicamente mais acessível que outras técnicas (ARNFIELD et al., 2013). Dessa maneira, utilizar a neuroimagem através da RM pode auxiliar no processo de reabilitação destes pacientes, já que sem identificação do local e da extensão da lesão os tratamentos se tornam mais imprecisos e inconsistentes (ACCARDO et al., 2004).

Os sintomas na Paralisia Cerebral incluem anormalidades no tônus muscular, na postura e função motora. São geralmente acompanhadas de alterações de percepção, sensibilidade, comportamento e deformações em ossos e músculos (ROSENBAUM et al., 2007; PERENC et al., 2015). Déficits nas funções motoras e cognitivas estão relacionados com perda neuronal no córtex cerebral e no núcleo estriado (VAN DE BERG et al., 2000).

Pacientes com PC apresentam-se clinicamente com distúrbios como a síndrome do motoneutônio superior, com sinais positivos e negativos. Sinais positivos são aqueles que indicam ausência de inibição de circuitos corticais, como

aumento dos reflexos, espasticidade, hipertonicidade e malformações musculoesqueléticas. Já os sinais negativos são classificados como aqueles em que o desenvolvimento do controle sensoriomotor está ausente ou diminuído. Tais sinais levam à atrofia, fraqueza muscular, falta ou diminuição de coordenação de movimentos, pouco equilíbrio e marcha característica em tesoura (KRIGGER, 2006; RICHARDS E MALOUIN, 2013). Esses pacientes apresentam alterações na projeção de neurônios do córtex motor para os motoneurônios da medula espinal (RICHARDS E MALOUIN, 2013). Este fato acarreta inabilidade em controlar as funções motoras por conta da redução do número de unidades motoras efetivas, o que leva a danos no controle de movimentos voluntários e pode afetar diretamente a capacidade exploratória, o aprendizado e a independência (KOMAN et al., 2004; JONES et al., 2007).

O aumento do tônus muscular inibe o crescimento do músculo e leva a uma falha progressiva no ritmo de crescimento do comprimento entre ele e o osso, promovendo contraturas musculares e articulares (BLAIR, 2010). Os quadris das crianças com PC são normais ao nascimento, mas, com a perda do controle motor seletivo e presença de desequilíbrios do tônus muscular, as deformidades vão surgindo, como coxa valga, displasia acetabular, luxação do quadril e anteversão femoral (BLAIR, 2010; CHAN E MILLER, 2014). Associado às lesões motoras, indivíduos com PC possuem alta prevalência de osteopenia, osteoporose e desnutrição. Estas condições podem afetar a atividade física dos pacientes, ou a ausência de atividade ser a causa do aparecimento destes fatores e promover a piora do quadro (RICHARDS E MALOUIN, 2013).

A expectativa de vida para crianças com PC com comprometimento leve ou moderado não difere muito das saudáveis, mas nas formas graves até 50% dos indivíduos vão a óbito nas primeiras duas décadas de vida (HUTTON et al., 1994). Estes poderão ainda sobreviver até ao meio da terceira década se tiverem boas condições nutricionais, controle de infecções pulmonares e acesso a cirurgias, dependendo totalmente dos pais e de serviços de saúde comunitários. Estas medidas são muito bem-vindas se ajudarem na melhora da qualidade de vida dos pacientes (EUNSON, 2012).

2.3.2 Paralisia Cerebral Experimental

Com o objetivo de reproduzir os efeitos da Paralisia Cerebral, existem estudos com modelos experimentais que utilizam agressões nos períodos de gestação e lactação, produzindo déficits motores e sensoriais (STRATA et al., 2004; COQ et al., 2008; MARCUZZO et al., 2008; 2010; BOKSA, 2010; STIGGER et al., 2011; HU et al., 2013; WILSON, 2015; SILVA et al., 2016; LACERDA et al., 2017). A metodologia empregada é bastante heterogênea, existindo, então, diversos métodos de desenvolvimento da PC experimental.

A variação entre os modelos acontece principalmente com relação ao tempo necessário para o insulto (período gestacional, período neonatal), ao mecanismo de lesão (hemorragias intracranianas, isquemia cerebral, inflamações, asfixia, restrição sensório-motora), e à espécie (ratos, coelhos, camundongos) (STRATA et al., 2004; COQ et al., 2008; MARCUZZO et al., 2008; 2010; SAADANI-MAKKI et al., 2008; CHUA et al., 2009; BOKSA, 2010; STIGGER et al., 2011; HU et al., 2013; WILSON, 2015; SILVA et al., 2016; LACERDA et al., 2017).

Diversos estudos mimetizam a paralisia cerebral através de injeções de lipopolissacarídeos (LPS). O LPS é um componente da parede celular de bactérias gram-negativas que, quando administrado, promove reações inflamatórias (BOKSA, 2010). Para promoção da paralisia cerebral experimental, a administração de LPS é realizada durante o período gestacional ou pós-natal dos animais. As reações inflamatórias geradas provocam alterações cerebrais (ativação de células gliais e hipomielinização em diversas áreas, como corpo caloso, ventrículos laterais, cápsula interna e hipocampo) e sequelas motoras e sensitivas (aumento do tônus muscular, redução da locomoção, equilíbrio e coordenação motora, comprometimento na postura e do desenvolvimento dos reflexos) no período pós-natal (WANG et al., 2006; GIRARD et al., 2008; SAADANI-MAKKI et al., 2008; BOKSA, 2010; KANNAN et al., 2011; STIGGER et al., 2011; HU et al., 2013; ROUSSET et al., 2013). Contudo, os efeitos causados pela inflamação através do LPS não são contínuos durante a fase adulta, visto que os animais não apresentaram déficits no desenvolvimento motor cerebral correlacionadas com a PC aos 120 dias de vida (ROUSSET et al., 2013).

A hemorragia intracraniana é uma complicação que pode provocar doenças neurológicas como a paralisia cerebral, assim como a isquemia cerebral (CHUA et al., 2009; MACHADO et al., 2015). Alguns estudos utilizaram a hemorragia intraventricular para simular esta patologia em animais. Verificaram, então, que estes apresentaram gliose, hipomielinização, redução da espessura cortical, ventriculomegalia, deficiências no aprendizado e memória e déficits motores semelhantes aos apresentados pelos humanos, como fraqueza muscular, lentidão na locomoção e atraso no desenvolvimento de reflexos (BALASUBRAMANIAM et al., 2006; CHUA et al., 2009; LEKIC et al., 2011; MUKAI et al., 2017). Outros realizaram isquemia através da oclusão temporária da artéria cerebral média (MANABAT et al., 2003) ou da artéria carótida (RENOLLEAU et al., 1998), porém a limitação destes estudos se dá pela ausência de mensuração da perfusão sanguínea após o procedimento de isquemia.

Alguns pesquisadores utilizaram a anóxia ou a hipóxia-isquemia perinatal para promover, nos animais, alterações que se assemelhem à Paralisia Cerebral humana. Ambas as agressões são causas importantes de lesões cerebrais com alto risco de déficits neurológicos no futuro (LUBICS et al., 2005), além de ser um estímulo não invasivo e global (KUMAR et al., 2019). Provocam lesões como atrofia do hipocampo e no córtex motor, redução da densidade de células gliais, gliose, ruptura axonal, maior morte celular, prejuízo da memória espacial, habilidades motoras prejudicadas e retardo do crescimento somático e do desenvolvimento de reflexos (LUBICS et al., 2005; ROBINSON et al., 2005; ITO, 2010; TAKADA et al., 2011; KUMAR et al., 2019).

A imobilização de partes do corpo acarreta baixa funcionalidade e/ou atrofia induzida pelo desuso, levando ao prejuízo do controle motor (BRITO et al., 2011). Modelos de desuso dos membros posteriores têm sido usados a fim de se obter efeitos mais duradouros no sistema muscular e assim estudar as adaptações do músculo esquelético ao desuso crônico e os efeitos deste neste sistema (COUTINHO et al., 2002; BRITO et al., 2011; STIGGER et al., 2011). Nestes estudos os pesquisadores observaram que, após o período de imobilização, os músculos apresentaram menor quantidade das proteínas de síntese e maior das proteínas de degradação muscular. Também verificaram redução do conteúdo de glicogênio,

redução da área de secção transversa, alteração do fenótipo das fibras rápidas para fibras lentas, atrofia muscular com redução do peso, comprimento e número de sarcômeros em série do músculo (COUTINHO et al., 2002; BRITO et al., 2011; STIGGER et al., 2011).

No presente estudo utilizamos o modelo que associa a anóxia perinatal com a restrição sensório-motora. Com este modelo é possível obter alterações tanto a nível central quanto periférico e um fenótipo mais próximo da Paralisia Cerebral, além de ser um modelo de fácil reprodução, pequena mortalidade e custo baixo. Proposto inicialmente por Strata e cols. (2004) seguido por Coq e cols. (2008), neste modelo o animal é submetido a um episódio de ausência de oxigênio nos dois primeiros dias de vida, durante 12 minutos cada dia. Do segundo dia em diante é realizada a imobilização dos membros posteriores, mantendo-os estendidos por 16 horas diárias. Os autores observaram que os animais submetidos a este modelo apresentaram efeitos duradouros semelhantes aos encontrados em pacientes com PC, como a taxa de crescimento corporal reduzida, aumento do tônus e atrofia muscular, marcha de padrão anormal, degeneração articular no joelho e tornozelo, além de alterações topográficas na representação da pata posterior nos córtices motor e sensitivo.

Outros estudos mais recentes sobre esse modelo mostram alterações semelhantes e que seguem a mesma linha de distúrbios relacionados com a PC humana. Estes estudos encontraram atraso na aquisição de marcos do desenvolvimento, prejuízo da atividade locomotora, redução do tamanho da passada, redução da área de secção transversa do músculo, degeneração articular, diminuição do peso corporal, piora dos aspectos morfofuncionais da mastigação, redução do número de neurônios no córtex somatossensorial e redução na espessura do córtex cerebelar (MARCUIZZO et al., 2008; 2010; STIGGER et al., 2011; SILVA et al., 2016; LACERDA et al., 2017).

Assim, o modelo experimental de paralisia cerebral utilizado atua diretamente na plasticidade cerebral, por promover insultos exatamente no período crítico do desenvolvimento cerebral e do desenvolvimento de parâmetros locomotores, promovendo alterações no desenvolvimento neuromotor e nos tecidos neurais (MARCUIZZO et al., 2010; MARQUES et al., 2014; SILVA et al., 2016; LACERDA et

al., 2017). Dessa forma, o modelo permite a observação e acompanhamento do desenvolvimento neural diante da PC induzida, ajudando no esclarecimento das modificações neurais e motoras.

3 HIPÓTESE

A suplementação de ácido fólico, quando aplicadas no período pós-natal, reverte os danos no desenvolvimento neuromotor e aumenta a densidade de células neurais no córtex somatossensorial e motor de animais acometidos pela paralisia cerebral.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar os efeitos da suplementação pós-natal de ácido fólico (vitamina B9) sobre a maturação somática, ontogênese reflexa e morfologia cortical de ratos submetidos ao modelo de paralisia cerebral.

4.2 ESPECÍFICOS

Em ratos, submetidos ao modelo de paralisia cerebral e suplementados ou não com ácido fólico no período neonatal:

- Avaliar a maturação das características físicas, o desenvolvimento somático e a ontogênese dos reflexos;
- Quantificar o número de neurônios por campo nos córtices motor e somatossensorial aos 29 dias pós-natal;
- Mensurar a área de secção transversa do corpo celular neuronal nos córtices motor e somatossensorial aos 29 dias pós-natal;
- Determinar o número de células gliais e a relação glia-neurônio nos córtices motor e somatossensorial aos 29 dias pós-natal.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório Multiusuário de estudos em Exercício Físico e Plasticidade Fenotípica (Centro Acadêmico de Vitória – CAV – UFPE), no Laboratório Multiusuário/Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (Departamento de Nutrição/LENIB – Recife – UFPE) e no Laboratório de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica da UFPE. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE sob o número 0016/2018.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da raça *Rattus Novergicus Albinus*, da linhagem *Wistar*, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da UFPE – Recife. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação, com temperatura de 22°C $\pm$ 1, num ciclo invertido de luz constante (escuro das 08:00 às 20:00 h; claro das 20:00 às 08:00 h) e livre acesso à água e alimentação. Para obtenção das ninhadas foram utilizadas ratas primíparas (n=14) com idade entre 90 e 120 dias de vida e peso entre 220 e 250 gramas, acasaladas numa proporção de 2 fêmeas para 1 macho. A prenhez foi diagnosticada através da constatação de espermatozoides no esfregaço vaginal e acompanhamento do peso corporal das ratas. Durante o período de gestação, as ratas foram alocadas em gaiolas individuais e continuaram em condições padrão de biotério até o nascimento dos filhotes. As ninhadas foram compostas no dia do nascimento pela nutriz e oito ratos neonatos machos (peso entre 5 e 7 gramas) escolhidos aleatoriamente.

5.2 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

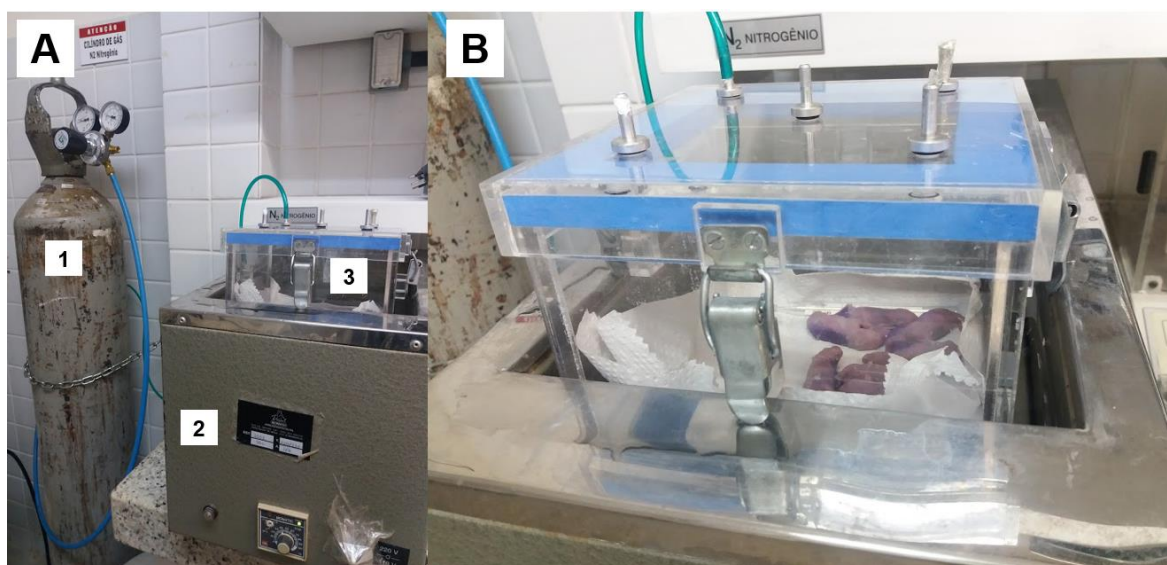
Desde o nascimento foram constituídos os seguintes grupos experimentais: Grupo Controle Salina (n=14) e Grupo Paralisia Cerebral Salina (n= 15), cujos

filhotes receberam solução de salina estéril (Cloreto de sódio, NaCl, 0,9%, 10 µl/g) uma vez ao dia, via subcutânea; Grupo Controle Ácido fólico (n=17) e Grupo Paralisia Cerebral Ácido fólico (n=17), cujos filhotes receberam solução de ácido fólico (Sigma; dissolvido em solução salina numa concentração de 50 mg de AF/100 ml NaCl, aplicados 10 µl/g, sendo doses de 5 mg/kg) uma vez ao dia (adaptado de MATTÉ et al., 2007; LALONDE et al., 1993), via subcutânea. As aplicações de salina e ácido fólico foram realizadas diariamente, às 07h30min, do 1º ao 21º dia de vida. Os animais foram mantidos com suas respectivas mães até os 25 dias de vida pós-natal, quando foram desmamados e separados em gaiolas (máximo de 4 animais do mesmo grupo experimental por gaiola) até os 29 dias de vida pós-natal, data em que realizamos o sacrifício dos mesmos para coleta do encéfalo.

5.3 MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL

O modelo foi baseado nos experimentos de Strata et al. (2004), Coq et al. (2008) e Marcuzzo et al. (2008), que associa a anóxia perinatal a um modelo de restrição sensório-motora dos membros posteriores, semelhante à paraparesia espástica ocorrida na PC. Os filhotes foram submetidos a dois episódios de anóxia pós-natal, um no dia do nascimento e outro no dia seguinte. Para isso, em cada anóxia os animais foram colocados dentro de uma câmara de vidro parcialmente imersa em água a 37°C e expostos a nitrogênio (100%) a 9L/min durante 12 minutos. Em seguida foram recolocados em temperatura e concentração gasosa ambiente e, após recuperarem coloração e padrão respiratório normais, foram devolvidos às suas respectivas mães (Fig. 3).

Figura 3 – Anóxia pós-natal.

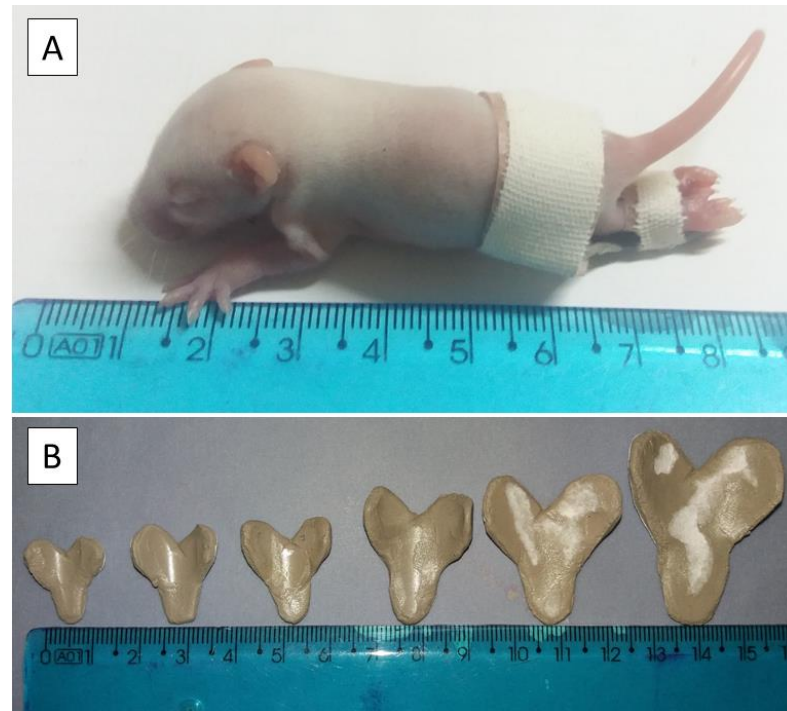


A1 = cilindro de nitrogênio; A2 = Aparelho de banho-maria; A3 = Câmara de anóxia; B = Animais dentro da câmara no momento da submissão à anóxia pós-natal. Fonte: Do autor.

Do 2º ao 28º dia pós-natal foi feita a restrição sensório-motora durante 16 horas por dia (sendo 11h de restrição no período claro do ciclo). Nas 8 horas restantes a livre movimentação do animal foi permitida, quando eram realizadas as avaliações. Para a imobilização sensório-motora utilizamos um molde de epóxi que permite apenas movimentos limitados da articulação do quadril, deixando os membros posteriores estendidos, sem prejuízo da eliminação de urina e fezes e dos cuidados maternos. Para fixar o animal à órtese de epóxi foram utilizadas fitas micropore e esparadrapo, de modo a causar o mínimo de ferimentos (Fig. 4).

No momento de retirada da órtese e fitas adesivas alguns cuidados foram necessários, a fim de provocar o menor desconforto possível aos animais, através das seguintes etapas: 1) Uso de tesoura pequena e cotonete embebido em óleo mineral inodoro para facilitar a retirada do esparadrapo e fita micropore colada ao animal; 2) Limpeza de fezes e do óleo mineral nas patas posteriores com auxílio de um algodão encharcado com água/álcool, quando necessário; 3) Aplicação de antisséptico imediatamente após a retirada da órtese e das fitas nos locais onde apresentavam ferimentos, para facilitar cicatrização e reduzir o risco de infecções.

Figura 4 – Restrição sensório-motora.



A = Animal submetido à restrição sensório-motora utilizando a órtese de epóxi; B = Diferentes dimensões das órteses para adequação às idades e ao comprimento dos animais. Fonte: Do autor.

5.4 DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO E MATURAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS

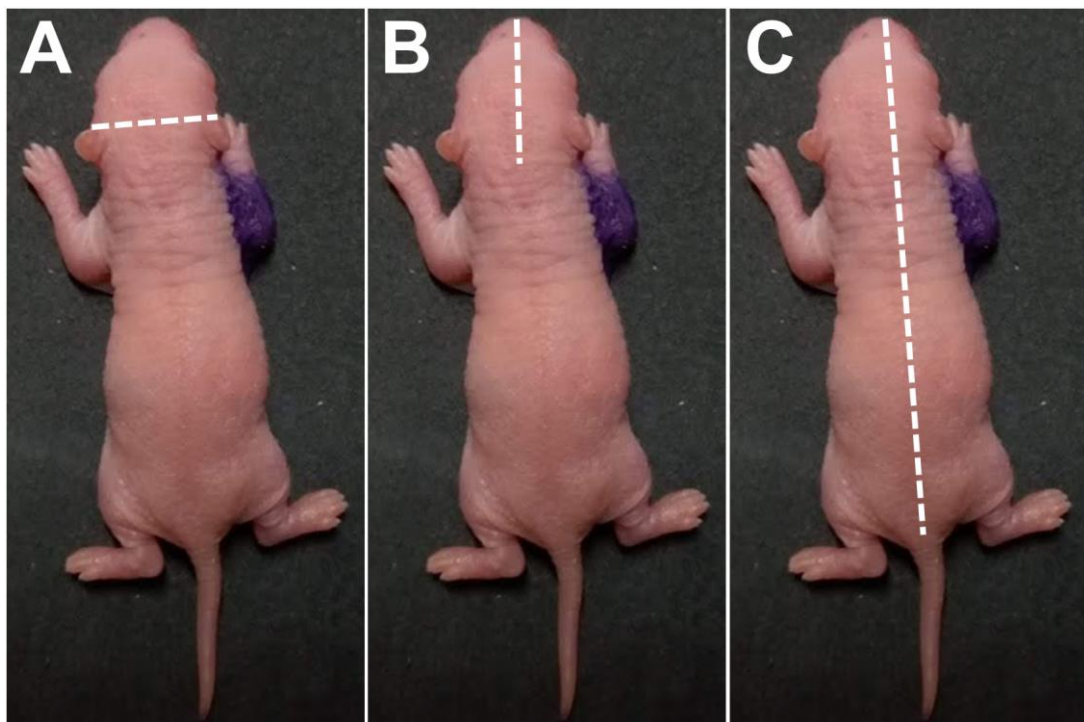
Cada animal foi avaliado nos dias 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 pós-natal às 14:00h, com auxílio de um paquímetro digital (@JOMARCA; precisão de 0,01 mm), quanto às seguintes medidas em centímetros (SILVA et al., 2005): eixo látero-lateral do crânio, eixo anteroposterior do crânio e eixo longitudinal (Fig. 5). O peso de cada filhote foi registrado diariamente até 21 dias, no momento da aplicação dos tratamentos e no dia do sacrifício, utilizando uma balança Marte, modelos S-100, capacidade de 1 kg e sensibilidade de 0,01 g. Quanto à maturação dos caracteres físicos (abertura do pavilhão auditivo, abertura do conduto auditivo, erupção dos incisivos inferiores e superiores e abertura dos olhos), cada animal foi analisado diariamente às 14:00h, anotando o tempo em dias desde o nascimento até a maturação da característica física avaliada (SMART E DOBBING, 1971).

Eixo látero-lateral do crânio: Foi utilizada como referência a linha imaginária perpendicular ao eixo longitudinal do crânio, que divide os pavilhões auriculares ao meio. O animal foi contido com uma das mãos e medida a distância entre as margens anteriores dos pavilhões.

Eixo anteroposterior do crânio: A referência considerada para a medida do eixo anteroposterior do crânio foi a linha média que vai da extremidade do focinho até a base do osso occipital do animal.

Eixo longitudinal: Com o dorso do animal comprimido de encontro a uma superfície plana coberta com papel, foram feitas marcas com uma caneta no papel, coincidentes com o focinho e a base da cauda (ânus) do animal. Mediu-se então a distância em mm entre os pontos obtidos.

Figura 5 – Avaliação do desenvolvimento somático do animal.



A = Eixo látero-lateral do crânio; B = Eixo anteroposterior do crânio; C = Eixo longitudinal. Fonte: Do autor.

Abertura do pavilhão auditivo: Maturado quando os dois pavilhões, dobrados sobre o orifício auricular desde nascimento, desfaziam a dobra e ficavam livres e palpáveis pelo avaliador.

Abertura do conduto auditivo: Quando os dois orifícios auriculares, obliterados, abriam-se e tornavam-se visíveis, a característica era considerada madura.

Erupção dos incisivos inferiores e dos incisivos superiores: A erupção dos incisivos inferiores e superiores foi observada individualmente, sendo maturada com o rompimento da gengiva com exposição incisal.

Abertura dos olhos: A maturação foi verificada quando ambos os olhos estavam totalmente abertos e com a presença de movimento palpebral.

5.5 ONTOGÊNESE DOS REFLEXOS

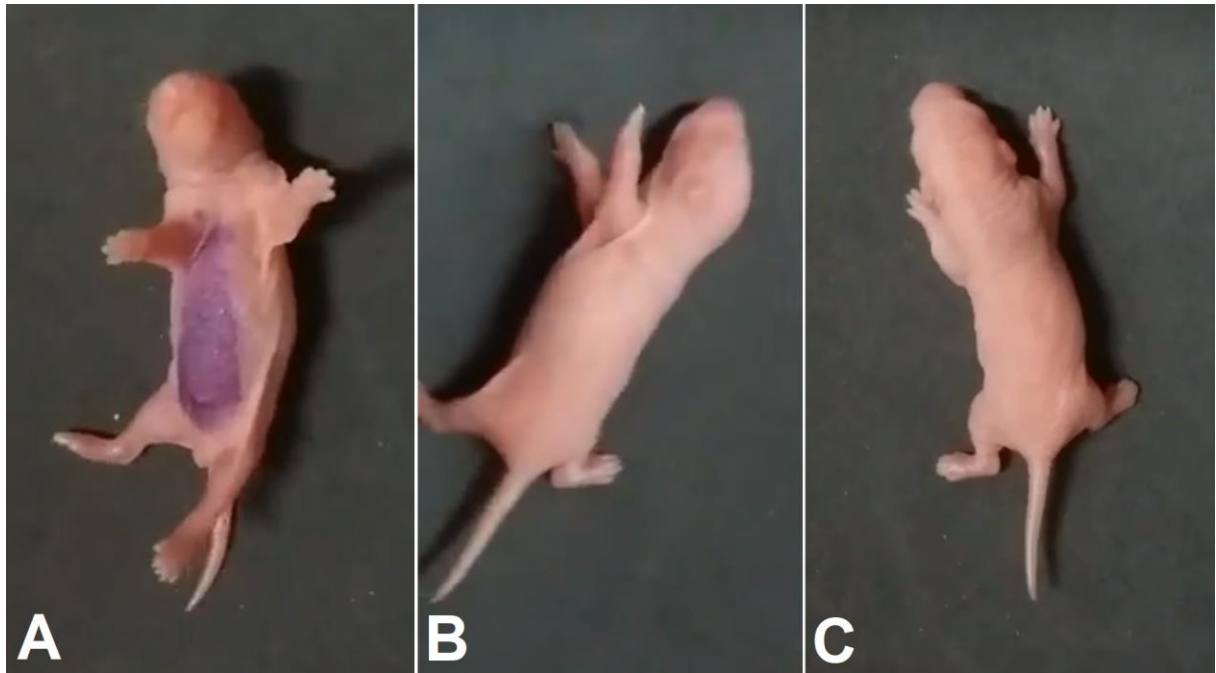
O desenvolvimento dos seguintes reflexos foi analisado diariamente às 14:00h, em cada animal dos diferentes grupos, do 1º ao 21º dia pós-natal (modificado de Smart e Dobbing, 1971): preensão palmar, recuperação de decúbito, colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício, geotaxia negativa, resposta ao susto e queda livre. Para cada reflexo, o dia da consolidação do mesmo foi considerado o primeiro dia, de uma sequência de três dias consecutivos, do aparecimento completo da resposta reflexa esperada.

Preensão palmar: Foi realizada percussão leve na palma da pata dianteira esquerda de cada animal, utilizando um bastonete fino de metal (aproximadamente 5 cm de comprimento e 1mm de diâmetro). A resposta foi considerada positiva quando houve uma flexão rápida dos dedos após duas tentativas. Nessa avaliação, em especial, foi observado tempo de desaparecimento do reflexo, ou seja, ausência da resposta positiva.

Recuperação de decúbito (Fig. 6): O animal foi colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana. A resposta foi considerada positiva quando, num

período máximo de 10 segundos, ele girou o corpo e posicionou-se em decúbito ventral, estando apoiado nas quatro patas.

Figura 6 – Sequência da realização do reflexo de recuperação em decúbito.



A = Posição do animal no início da avaliação do reflexo, com o dorso apoiado na mesa; B = Posição do animal no processo de execução do reflexo, girando o corpo; C = Posição do animal ao finalizar a execução do reflexo, apoiado em decúbito ventral. Fonte: Do autor.

Colocação pelas vibrissas: O rato foi suspenso pela cauda com suas vibrissas tocando a borda de uma mesa. Quando, no tempo máximo de 10 segundos, o animal colocou as patas anteriores sobre a mesa tentando caminhar nela, a resposta foi considerada positiva.

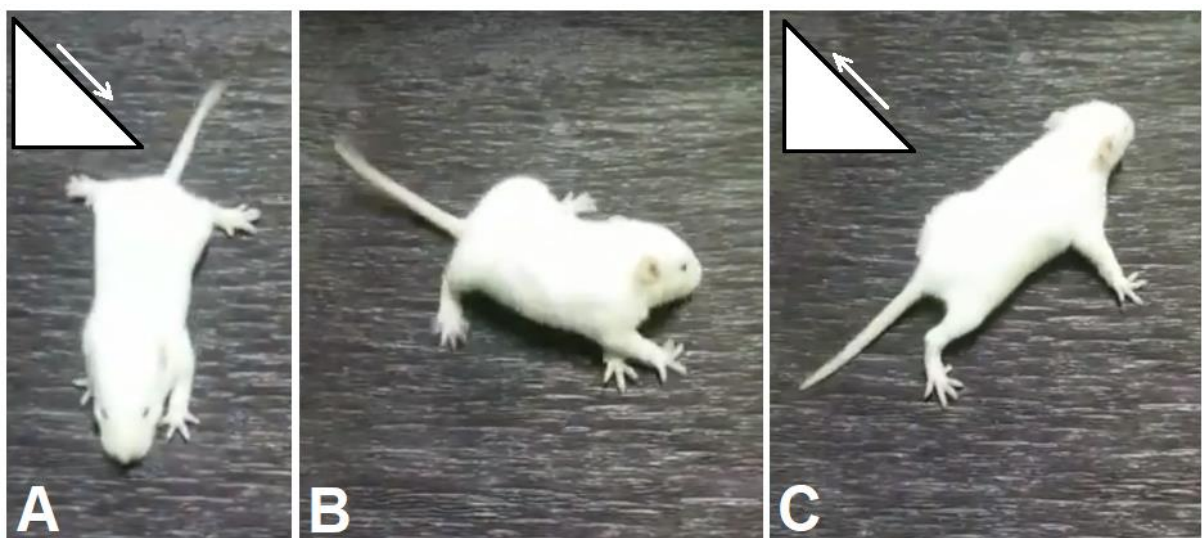
Aversão ao precipício: O animal foi colocado com as patas dianteiras sobre a margem de uma superfície plana e alta, a fim de detectar o precipício. A resposta foi considerada positiva quando o animal, no tempo máximo de 10 segundos, se deslocou no mínimo a 45° do precipício, indicando a aversão.

Resposta ao susto: O rato foi submetido a um estalo agudo, produzido através do batimento de um bastão sobre um recipiente, ambos metálicos, a uma distância

aproximada de 10 cm do animal. A resposta foi considerada positiva quando ocorreu uma imediata e rápida retração do animal, característica de susto.

Geotaxia negativa (Fig. 7): O animal foi colocado com a cabeça no sentido descendente no centro de uma rampa de 45° de inclinação, revestida com papel crepom (Fig. 7A). A resposta reflexa foi considerada positiva quando o animal, em no máximo de 10 segundos, girou o corpo em mínimo 140°, posicionando a cabeça em sentido ascendente.

Figura 7 – Sequência da realização do reflexo de geotaxia negativa, com o animal em um plano inclinado a 45 graus.



A = Posição do animal, com a cabeça no sentido descendente; B = Posição do animal durante o processo de execução do reflexo, girando o corpo; C = Posição do animal ao executar o reflexo, com a cabeça em sentido ascendente. Detalhe no canto superior das fases A e C indica a posição da cabeça (direção da ponta da seta) no plano inclinado. Fonte: Do autor.

Queda livre (Fig. 8): O rato foi segurado pelas quatro patas, com o dorso voltado para baixo, a uma altura de 30 cm (tendo uma régua de 30 cm como guia, perpendicular ao plano) (Fig. 8A). O animal foi solto e foi observada sua queda livre sobre um leito de algodão. A resposta foi considerada positiva quando o animal girou completamente o corpo, caindo na superfície apoiado sobre as quatro patas e o ventre para baixo (Fig. 8B).

Figura 8 – Sequência da realização do reflexo de queda livre.



A = Posição inicial do animal, com dorso voltado para baixo numa altura de 30 centímetros do leito de algodão; B = Posição final do animal, apoiado sobre as quatro patas, ao tocar a superfície do leito de algodão. Fonte: Do autor.

5.6 PERFUSÃO TRANSCARDÍACA E RETIRADA DO ENCÉFALO

Os animais foram anestesiados profundamente com Ketamina (60mg/Kg pc) e Xilazina (7,5 mg/kg pc) para realização da perfusão transcárdica. Após abertura da cavidade torácica foi introduzida uma cânula para perfusão no ventrículo esquerdo. Uma bomba peristáltica foi acoplada à cânula e acionada em velocidade compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Inicialmente foram infundidos 150ml de solução salina (NaCl, 0,9%) tamponada com tampão fosfato. A perfusão com salina seguiu com a infusão de 200 ml solução fixadora (paraformaldeído a 4%). Ao final da passagem do fixador, os encéfalos foram

retirados do crânio (Fig. 9) e pós-fixados na mesma solução fixadora overnight. Em seguida, foram imersos em solução de sacarose (30%) por aproximadamente 48 horas. Após esse período, foram congelados com n-hexano e armazenados em freezer -80°C para criosecção.

Figura 9 – Encéfalos após perfusão.



À esquerda: Momento de retirada do encéfalo do animal; à direita: Encéfalos de um animal de cada grupo experimental, lado a lado. Fonte: Do autor.

5.7 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO CÓRTEX MOTOR

Os encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 20 μ m de espessura utilizando-se criostato (Leica®). Para cada animal, as séries de cortes coronais foram coletadas em placa de acrílico contendo 24 cavidades com solução anticongelante (Figura 8). Após a coleta, cada placa foi armazenada a -20°C, para posterior montagem em lâminas gelatinizadas.

Após montagem nas lâminas, os cortes obtidos foram corados com Violeta de Cresil e analisados, para identificação das áreas de representação dos membros inferiores no córtex somatossensorial (S1) e no córtex motor (M1) (Figura 9). Para identificação das áreas foram utilizadas coordenadas estereotáticas (-2,3 a -3,3 mm de bregma para S1; 3,0 a 0 mm de bregma para M1) (PAXINOS e WATSON, 2006).

Após identificação, as imagens microscópicas foram capturadas e digitalizadas em 40x.

Os campos microscópicos foram obtidos através de microscópio óptico Leica modelo DM-500 (objetiva 40x) acoplado a um programa para captação de imagens. Para contagem das células foi utilizado o software ImageJ (versão 1.8). Para cada rato, neurônios e células gliais foram contados em 10 campos de cada corte (cinco no hemisfério esquerdo e cinco no direito). Os neurônios foram identificados pelo seu tamanho geralmente maior e de contorno não esférico, já as células da glia foram identificados pelo seu aspecto esférico. O índice glia-neurônio foi calculado como a proporção de células da glia por neurônios em cada campo (adaptado de Marcuzzo et al., 2010).

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados quanto à distribuição normal e quanto à homogeneidade das variâncias utilizando o Software Prisma 5. Atendidos esses requisitos, para as comparações foi aplicado, no mesmo Software, o teste paramétrico Anova Two-Way seguido do pós-teste de Bonferroni/Tukey, devido às variáveis de grupos e de suplementação, assim como pela repetição das análises ao longo dos dias. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão, sendo o nível de significância utilizado de 5% ($p < 0,05$). Quando não foi observada distribuição normal nem homogeneidade das variâncias, foi adotado o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunns. Os resultados são expressos como mediana e valores mínimo e máximo, sendo utilizado o intervalo de confiança de 95%.

6 RESULTADOS

Esta tese originou resultados que serão apresentados em forma de artigos.

6.1 ARTIGO 1 – NEONATAL TREATMENT WITH FOLIC ACID INCREASES THE NUMBER OF NEURAL CELLS OF SPECIFIC CORTEX AREAS IN RAT MODEL OF CEREBRAL PALSY

Artigo original elaborado segundo os objetivos, metodologias e resultados da presente tese. Foi enviado para publicação na revista “Experimental Neurology”, conceito CAPES A1 para Medicina II e Fator de Impacto 4.562. O artigo encontra-se na íntegra no Apêndice A, no final deste exemplar.

6.2 ARTIGO 2 – ALTERAÇÕES NEUROANATÔMICAS OBSERVADAS ATRAVÉS DE IMAGENS POR TENSORES DE DIFUSÃO NA PARALISIA CEREBRAL ESPÁSTICA DIPLÉGICA: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Artigo de revisão sistemática a ser enviado para a revista “Neuroimage: Clinical”, conceito CAPES A1 para Medicina II e Fator de Impacto 3.943.

Alterações neuroanatômicas observadas através de Imagens por tensores de Difusão na Paralisia Cerebral Espástica Diplégica: uma revisão sistemática

A Paralisia Cerebral (PC) é uma síndrome complexa devido a lesões no cérebro ainda em desenvolvimento do feto ou da criança. Pacientes com PC possuem lesões em diversas áreas do sistema nervoso e por isso apresentam diversas classificações. Técnicas de neuroimagem vêm sendo utilizadas a fim de identificar os locais de lesão e sua extensão, podendo contribuir com estratégias terapêuticas nestes pacientes. O objetivo do estudo foi identificar as alterações neuroanatômicas em crianças com paralisia cerebral espástica diplégica através de Imagens

por Tensores de Difusão. Foram realizadas buscas nas seguintes bases de artigos: Pubmed/Medline, Scopus e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Não foram aplicados filtros de língua nem de ano de publicação. Os descritores utilizados para a presente revisão sistemática da literatura foram: Paralisia Cerebral e Imagem por Tensor de Difusão. Dos 391 artigos encontrados, 4 artigos passaram nos critérios de elegibilidade para esta revisão. Destes, 2 artigos investigaram o trato corticospinal e também 2 artigos investigaram a coroa radiada. Outras áreas também foram analisadas, como cápsula interna, corpo caloso e conexões entre tálamo e córtex cerebral. A anisotropia fracionada apresentou-se menor em todas as áreas informadas. Da mesma forma, todas as regiões mencionadas pelos autores demonstraram aumento da difusividade média. Estes achados podem auxiliar na escolha da melhor estratégia terapêutica para estes pacientes. Tais achados sugerem lesão axonal nas áreas mencionadas, que corroboram com os sinais clínicos apresentados pelos pacientes, auxiliam na classificação da doença e fornecem informações acerca do melhor caminho terapêutico para tratamento destes indivíduos.

Palavras-chave: Paralisia Cerebral; Imagem por Tensor de Difusão; Neuroimagem.

INTRODUÇÃO

A Paralisia Cerebral (PC) é uma síndrome considerada a causa mais comum de disfunção motora crônica na infância¹, que ocorre devido a transtornos no sistema nervoso central do feto ou da criança durante o desenvolvimento^{2,3}. A doença se apresenta de forma complexa e possui classificações mais comuns de acordo com a distribuição topográfica dos danos motores (diplégica, hemiplégica, quadriplégica) e de acordo com os sinais clínicos (hipotônica, espástica, distônica, atáxica e discinética)⁴.

Os sinais e sintomas da PC são resultantes de alterações em variadas partes do sistema nervoso, como trato piramidal, trato extrapiramidal, cerebelo e vias cerebelares, tronco encefálico, córtex cerebral e estruturas subcorticais^{1,5,6,7}. Devido à possibilidade de afetar diversas estruturas do sistema nervoso, técnicas modernas de neuroimagem vêm sendo utilizadas a fim de investigar a anatomia, detectar danos em locais específicos, a extensão e o impacto da lesão no paciente. Tais investigações auxiliam na diferenciação dos tipos de PC quanto à topografia, já que ainda existe esta dificuldade na prática clínica^{5,6}, além de contribuírem no processo de reabilitação dos mesmos, já que sem esses parâmetros os tratamentos ficam imprecisos inconsistentes⁸.

A ultrassonografia craniana pode rastrear lesões cerebrais em bebês em que há suspeita de lesão cerebral. Ela é o primeiro método a ser considerado, porém para utilização desta técnica é necessário que as fontanelas estejam bem abertas para melhor rendimento diagnóstico. Assim, quanto menor a fontanela, mais limitado é o uso desta técnica⁹.

A Tomografia computadorizada é uma técnica de neuroimagem capaz de traçar as lesões cerebrais em crianças com PC. Esta normalmente não é a técnica de escolha para diagnóstico e classificação da PC comparando com a Ressonância Magnética, por conta das radiações e pela menor sensibilidade da tomografia em detectar lesões nas substâncias branca e cinzenta, embora seja mais rápida e, na maioria das vezes, sem necessidade de sedação⁹.

A Ressonância Magnética (RM) é amplamente utilizada em pacientes pediátricos que possuem PC. 70% a 90% das crianças com esta patologia possuem alterações visíveis na RM, sendo um exame essencial na avaliação inicial da doença¹⁰. É considerada a técnica de neuroimagem padrão, principalmente quando a etiologia da doença não é conhecida, além de ser clinicamente mais acessível que outras técnicas¹¹. A RM funcional pode ser utilizada para estudo da conectividade cerebral e das modificações funcionais das vias enquanto a RM estrutural identifica alterações anatômicas, em especial lesões corticais¹². A sensibilidade da

RM aumenta em crianças a partir de 24 meses de idade, quando a mielinização está completa e as lesões podem ser melhor detectadas⁹.

A Imagem por Tensor de Difusão (DTI) é uma técnica/modalidade da ressonância magnética que utiliza a difusão da água em diferentes direções de acordo com a estrutura organizacional do tecido⁸. Ela pode ser avaliada sob duas medidas: 1. Anisotropia fracionada (FA) se refere à maneira como a orientação do movimento das moléculas de água está distribuído, caracterizando lesão tecidual quanto menor e mais próximo de zero for o valor da FA¹³; 2. Difusividade média (DM) indica a capacidade de difusão da água no tecido. Quando a DM está aumentada dá indícios de que o tecido não retém água e sugere degeneração do mesmo¹⁴.

Este tipo de análise é particularmente adequado para as fibras neurais¹⁵ e seu uso vem ganhando uma grande aplicabilidade clínica, para confirmar a classificação da PC, identificar danos em regiões específicas do sistema nervoso de algumas crianças e obter informações acerca da reorganização funcional após a lesão cerebral^{9,16}. É capaz de mapear vias na substância branca e identificar sua integridade de forma não invasiva⁸, possibilitando o estudo da estrutura do tecido cerebral e orientação de suas fibras¹⁷. Assim, FA e DM medem a desmielinização cerebral e caracterizam a lesão da substância branca¹⁸, sendo possível obter nas crianças com PC informações sobre a maturação neuronal, tendo em vista que esta é adquirida com o crescimento de axônios e dendritos¹⁹.

Estudos prévios verificaram a importância de correlacionar as lesões na substância branca com os sinais clínicos dos pacientes com PC²⁰⁻²⁴. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar na literatura quais as alterações cerebrais encontradas em pacientes com Paralisia Cerebral Espástica Doplégica (PCED) através da técnica de Imagens por Tensores de Difusão, a fim de fornecer dados que possam correlacionar os possíveis locais de lesão com os sinais clínicos destes pacientes.

MÉTODOS

Esta revisão sistemática está em conformidade com o “*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*” (PRISMA)²⁵. O protocolo da pesquisa está cadastrado e publicado no PROSPERO (número de registro CRD42018098713). Dois avaliadores independentes, KOGS e DBV, realizaram as buscas e triagem dos artigos das bases de dados eletrônicas e se reuniram para analisar a concordância entre os selecionados. Um terceiro

avaliador, AET, foi solicitado como mediador quando houve divergência entre os primeiros e definir a inclusão ou exclusão de estudos.

Foram realizadas buscas nos seguintes bancos de dados, no período de janeiro a abril de 2019: Pubmed/Medline (National Library of Medicine/ Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), Scopus e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Não foram aplicadas restrições de ano de publicação nem de idioma dos artigos. Para identificar os artigos a pesquisa utilizou a combinação do descritor “Cerebral Palsy” com “Diffusion Tensor Imaging” e/ou “Fractional Anisotropy”.

Dentre os critérios de inclusão, foram incorporados artigos originais cuja população tenha sido estudada através da técnica de neuroimagem de interesse além de serem crianças (de 0 a 12 anos) diagnosticadas com PCED. Os critérios de exclusão foram estudos cujos pacientes possuíam outras doenças associadas à Paralisia Cerebral (e que não tenham sido sua causa), que foram diagnosticadas com outro tipo de Paralisia Cerebral, artigos cujos dados da FA e/ou DM não estavam presentes e/ou quando não foi informado o tipo de PC específico dos indivíduos.

A avaliação do risco de viés dos estudos foi feita através da escala PEDro²⁶, versão validada e em português.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a busca nas bases de dados com os cruzamentos das palavras-chave encontrou um total de 391 artigos. Desses, 217 foram extraídos da base Pubmed/Medline, 136 da BVS e 38 da Scopus. Após a remoção das duplicatas restaram um total de 168 artigos dentre as bases de dados utilizadas. Estes foram avaliados de acordo com o título e resumo apresentados, e neste primeiro filtro foram excluídos 146 artigos. Em seguida, os 22 artigos restantes foram avaliados de forma aprofundada de acordo com os critérios de inclusão e exclusão e para extração de dados.

Após a leitura completa, 18 artigos foram excluídos porque realizaram pesquisas em adultos, estudaram outros tipos de Paralisia Cerebral ou não indicaram a classificação da PC do paciente estudado. Restaram ao final 4 artigos originais, publicados entre 2012 e 2014 (Figura 1).

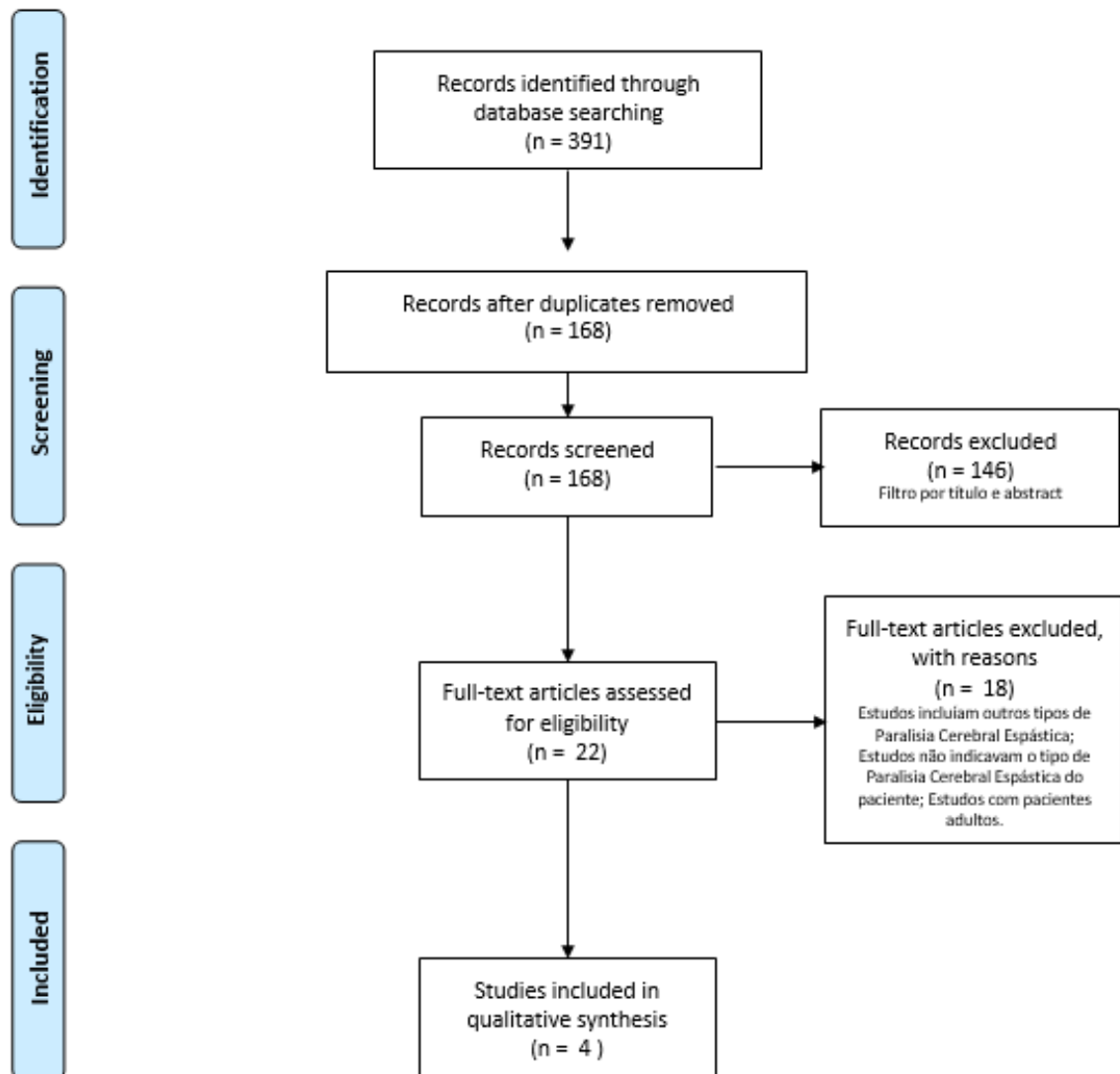


Figura 1: Fluxograma PRISMA²⁵ indicando o processo de triagem dos artigos.

A Fig. 2 mostra a avaliação dos artigos incluídos de acordo com os pontos assinalados na escala PEDro²⁶.

Autor e ano	Crêterios de elegibilidade	Distribuição aleatória dos grupos	Alocação aleatória dos sujeitos	Semelhança em relação aos indicadores diagnósticos	Cegamento dos sujeitos	Cegamento dos terapeutas	Avaliação cega de no mínimo um resultado-chave	Mensuração de resultados-chave em 85% dos sujeitos	Análise dos dados dos grupos por intenção de tratamento	Comparações estatísticas intergrupo	Medidas de precisão e de variabilidade
Papadelis et al. ²⁷	+	N.A.	N.A.	+	N.A.	-	-	-	N.A.	N.A.	+
Chang et al. ²⁸	+	N.A.	N.A.	+	N.A.	-	-	+	N.A.	N.A.	+
Cho et al. ²⁹	+	N.A.	N.A.	+	N.A.	+	+	+	N.A.	N.A.	+
Rai et al. ³⁰	+	N.A.	N.A.	+	N.A.	-	-	+	N.A.	N.A.	+

Figura 2. Análise da qualidade dos estudos de acordo com a escala PEDro. + = Artigo informou sobre o critério avaliado; - = Artigo não informou sobre o critério avaliado; N.A. Critério avaliado não se aplica ao tipo de estudo analisado.

Considerando apenas os pontos que se aplicavam aos estudos selecionados, em um total de 6 pontos, apenas um estudo²⁹ possuía todas as características importantes. Os demais^{27,28,30} continham déficits metodológicos com até 50% dos critérios incluídos no estudo.

A distribuição aleatória dos grupos não foi realizada em nenhum dos estudos. Como não era aplicado nenhum tipo de tratamento, mas apenas procedimentos de neuroimagem, não foi necessária a aleatorização na alocação dos pacientes/grupos. Da mesma maneira, o cegamento dos sujeitos não se fazia necessário. Quanto ao cegamento dos terapeutas, apenas um estudo realizou tal procedimento²⁹, com a finalidade de não ter resultados tendenciosos já que o mesmo comparou os achados de neuroimagem em pacientes com diplegia com os que possuíam quadriplegia espástica, a fim de verificar se os achados de neuroimagem eram compatíveis com os achados clínicos dos mesmos. Como a maioria dos estudos não tiveram cegamento dos sujeitos/grupos nem dos terapeutas, a análise dos resultados destes estudos t mb m não foi cega, exceto pelo único experimento que utilizou de cegamento, como citado anteriormente.

A extração dos dados investigou nome do autor e ano do estudo, características da população estudada (número de pacientes, sexo, idade e classificação da doença de acordo com o sistema de classificação da função motora grossa, do inglês Gross Motor Function Classification System, GMFCS), características do exame de neuroimagem (campo, tipo de

ponderação e tempo de eco), as áreas de interesse que foram analisadas e os resultados encontrados (em relação à anisotropia fracionada, coeficiente de difusão aparente e/ou média de difusividade). Todos esses dados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Dados dos artigos incluídos neste estudo.

	Papadelis et al. ²⁷	Chang et al. ²⁸	Cho et al. ²⁹	Rai et al. ³⁰
Características da população estudada				
Número de indivíduos	4 (2♀; 2♂)	12 (6♀; 6♂)	54	22 (8♀; 14♂)
Idade	11,8 (±5,4)	2,8 (±2,1)	-	-
Grau da PC (escala GMFCS)	I e II	II	-	II
Características da DTI				
Campo magnético	3,0 Tesla	1,5 Tesla	1,5 Tesla	3,0 Tesla
Ponderação da análise	T1	-	-	T2 e FLAIR
Tempo de Echo	88 ms	-	76 ms	76 ms
Áreas analisadas				
Fibras Talamocorticais e corticotalâmicas	↓ FA; ↑ DM; ↓ nº de fibras	-	-	-
Trato corticoespinal	-	↓ FA e ↑ DM em MMII FA e DM normal em MMSS	↓ FA ↑ DM	-
Coroa radiada	-	↓ FA ↑ DM	-	↓ FA; ↑ DM
Cápsula interna	-	-	-	↓ FA; ↑ DM
Corpo caloso	-	-	-	↓ FA; ↑ DM

Tronco Encefálico	-	-	-	↓ FA; ↑ DM
Medula espinal	-	-	-	↓ FA

Legendas: ♀ = sexo feminino; ♂ = sexo masculino; GMFCS = Gross Motor Function Classification System; FA = Fractional anisotropy (anisotropia fracionada); DM = Difusividade média; MMII = membros inferiores; MMSS = membros superiores.

A presente revisão objetivou sumarizar as alterações cerebrais de pacientes com Paralisia Cerebral Espástica Diplégica, visualizadas através da técnica de DTI, na intenção de contribuir com dados para que sejam correlacionadas tais alterações com os sinais clínicos dos pacientes. De acordo com os artigos analisados, as áreas de interesse investigadas nas crianças com PCED foram bastante heterogêneas. O trato corticospinal e a coroa radiada foi avaliado em 2 artigos. Demais regiões de interesse foram, principalmente, as conexões entre tálamo e giro pré-central e pós-central, corpo caloso e cápsula interna, tronco encefálico e medula espinal.

Na região do trato corticoespinal relacionada com os membros inferiores (MMII) foi verificada redução da FA e aumento na DM^{28,29}, enquanto que regiões do mesmo trato relacionadas aos membros superiores (MMSS) não foram vistas alterações²⁸. Yoshida et al.³¹ explica que o trato corticospinal amadurece mais rapidamente em lactentes saudáveis e a termo. FA reduzida no trato relacionado aos MMII indica lesão na via, o que nos dá uma informação pertinente, condizente com os achados clínicos dos pacientes destes estudos, com PC espástica diplégica, tendo em vista que o trato relacionado aos MMSS apresentou FA normal.

Chang et al.²⁸ e Rai et al.³⁰ encontraram redução da FA e aumento da DM na Coroa Radiada. Conexões entre tálamo e giros pré- e pós-central, no estudo de Papadelis et al.²⁷, apresentaram-se com FA reduzida, bem como também ocorreu redução do número de fibras nervosas em conexões tálamo-giro pré-central. Considerando que pacientes com PCED possuem alterações de sensibilidade e, principalmente, de motricidade, sendo mais acentuada ou exclusiva nos membros inferiores, estes achados reforçam os sinais clínicos apresentados pelos mesmos. Embora Papadelis e Cols²⁷ tenham uma amostra de apenas 4 pacientes e sem análise estatística dos dados, estes achados fornecem evidências anatômicas preliminares.

Chang et al.²⁸ explica que redução dos níveis de FA são indicativos de rompimento de bainha de mielina e microfilamento axonal, enquanto que aumentos de DM demonstram dano

axonal. A lesão do axônio é então substituída por água intersticial, o que também aumenta a difusividade média. Considerando que a maturação neuronal é conquistada com o crescimento axonal e dendrítico¹⁹, fica evidente que os pacientes com PC espástica diplégica apresentam danos nas estruturas investigadas, onde a FA apresentou-se reduzida e o DM aumentado.

Todos os estudos definiram os critérios de elegibilidade utilizados para recrutamento dos pacientes, que incluía avaliação neurológica por neurologistas pediátricos, ausência de síndromes genéticas associadas, sem histórico de traumas ou cirurgias cerebrais e classificação dos pacientes em graus I ou II de acordo com o sistema de classificação da função motora grossa³², que varia de I a V (sendo o nível V o de maior comprometimento motor). A GMFCS varia sua classificação nos 5 níveis de acordo com a faixa etária do paciente, mas de forma geral classifica como Grau I o paciente que deambula sem grandes limitações (sendo limitado apenas em atividades motoras mais complexas, como correr e pular) e Grau 2 quando o paciente deambula com algumas limitações na marcha, porém sem auxílio.

A mensuração dos resultados-chave em pelo menos 85% da amostra de pacientes não foi realizada apenas em um estudo²⁷, onde a amostra já foi pequena (n=4) e a análise foi realizada em apenas 2 pacientes (50% da amostra). Nos demais estudos todos os pacientes incluídos tiveram os dados de DTI nas respectivas regiões de interesse analisados.

O presente manuscrito apresentou algumas limitações: a) se restringiu a pacientes com paralisia cerebral espástica diplégica; b) quantidade de artigos encontrados foi baixa; c) as áreas de interesse analisadas entre os artigos foram variadas, não sendo possível a comparação entre os mesmos para a maioria das áreas.

CONCLUSÃO

A presente revisão sistemática da literatura demonstra que pacientes com PCED possuem característica de lesão axonal no trato corticospinal de membros inferiores, nas vias talamocorticais, corticotalâmicas e coroa radiada. Apesar disso, a quantidade de estudos que analisam as lesões cerebrais nestes pacientes através de imagens por tensores de difusão ainda é escassa e com áreas de interesse na investigação diversas, sendo necessários mais estudos que concentrem a investigação em áreas de interesse específicas.

Ainda assim, tais achados corroboram com os sinais clínicos apresentados pelos pacientes, além de serem uma base anatômica para classificação da Paralisia Cerebral destes. Esta visão geral também nos fornece informações acerca do melhor caminho terapêutico para

tratamento destes indivíduos, uma vez que as alterações podem ocorrer em diferentes regiões do sistema nervoso central.

CONFLITO DE INTERESSE E SUPORTE FINANCEIRO

Não houve conflito de interesse ou financiamento para a presente revisão.

REFERÊNCIAS

1. Colver A, et al. Cerebral Palsy. *Lancet*. 2014 Apr 5;383(9924):1240-49.
2. Rosenbaum P, et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl*. 2007 Feb;109:8-14. Errata em: *Dev Med Child Neurol*. 2007 Jun;49(6):480.
3. Bax M, et al. Proposed Definition And classification of cerebral palsy, April 2005. *Dev Med Child Neurol*. 2005 Aug;47(8):571-6.
4. Koman LA, et al. Cerebral Palsy. *Lancet*. 2004 May 15;363:1619-31.
5. Eunson P. Aetiology and epidemiology of Cerebral Palsy. *Paediatr Child Health*. 2012;22(9):361-6.
6. Rebel MF, et al. Motor Prognosis and Current Perspectives in cerebral palsy. *Ver Bras Crescimento Desenv Hum*. 2010;20(2):342–50.
7. Sanger TD, et al. Classification and definition of disorders causing hypertonia in childhood. *Pediatrics*. 2013 Jan;111(1):89-97.
8. Accardo J, et al. Neuroimaging in cerebral palsy. *J. Pediatr*. 2004 Aug;145(Supl 2):19-27.
9. Staudt M. Imaging cerebral palsy. *Handb Clin Neurol*. 2013;111:177-81.
10. Alexander H. Hoon Jr, Andreia Vasconcelos Faria. Pathogenesis, Neuroimaging and Management in Children with Cerebral Palsy Born Preterm. *Dev Disabil Res Rev*. 2010;16(4):302-312
11. Arnfield E, et al. Relationship between brain structure on magnetic resonance imaging and motor outcomes in children with cerebral palsy: a systematic review. *Res Dev Disabil*. 2013 Jul;34(7):2234-50.
12. Atkinson-clement C, et al. Diffusion Tensor Imaging in Parkinson's disease: Review and meta-analysis. *Neuroimage Clin*. 2017 Jul 15;16:98-110.
13. Schulte, T, et al. Corpus callosal microstructural integrity influences interhemispheric processing: a diffusion tensor imaging study. *Cereb. Cortex*. 2005;15(9),1384–1392.

14. Syková, E. Extrasynaptic volume transmission and diffusion parameters of the extracellular space. *Neurosci.* 2004;129(4):861–876.
15. Le Bihan, D. Looking into the functional architecture of the brain with diffusion MRI. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003;4(6):469–480
16. Gosling AS. Recent advances in the neuroimaging and neuropsychology of cerebral palsy. *Appl Neuropsychol Child.* 2017 Jan-Mar;6(1):55-63.
17. Mori S, et al. Three-dimensional tracking of axonal projections in the brain by magnetic resonance imaging. *Ann. Neurol.* 1999;45(2):265–269.
18. Song, SK, et al. Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *NeuroImage* 2002;17(3):1429–1436.
19. Kolb B, Gibb R. Brain plasticity and behaviour in the developing brain. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2011 Nov;20(4):265–76.
20. Thomas B, et al. Quantitative diffusion tensor imaging in cerebral palsy due to periventricular white matter injury. *Brain.* 2005;128:2562–2577.
21. Hoon AH, et al. Sensory and motor deficits in children with cerebral palsy born preterm correlate with diffusion tensor imaging abnormalities in thalamocortical pathways. *Dev Med Child Neurol.* 2009;51:697–704.
22. Yoshida S, et al. Quantitative diffusion tensor tractography of the motor and sensory tract in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 2010;52:935–940.
23. Yoshida S, Hayakawa K, Oishi K, et al. Athetotic and spastic cerebral palsy: Anatomic characterization in diffusion tensor imaging. *Radiology.* 2011;260:511–20.
24. Holmstrom L, et al. Diffusion MRI in corticofugal fibers correlates with hand function in unilateral cerebral palsy. *Neurology.* 2011;77:775–783.
25. Shiwa SR, et al. PEDro: a base de dados de evidências em fisioterapia. *Fisioter mov.* 2011 Sep; 24(3):523-533.
26. Moher D, et al. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med.* 2009 Jul 21;6(7):e1000097.
27. Papadelis C, et al. Cortical somatosensory reorganization in children with spastic cerebral palsy - a multimodal neuroimaging study. *Front Hum Neurosci.* 2014 Sep 12;8:725.
28. Chang MC, et al. Diffusion tensor imaging demonstrated radiologic differences between diplegic and quadriplegic cerebral palsy. *Neurosci Lett.* 2012 Mar 14;512(1):53-8.

29. Cho HK, et al. Diffusion Tensor Imaging–Demonstrated Differences between Hemiplegic and Diplegic Cerebral Palsy with Symmetric Periventricular Leukomalacia. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2013 Mar;34(3):650-4.
30. Rai Y, et al. DTI correlates of cognition in term children with spastic diplegic cerebral palsy. *Eur J Paediatr Neurol*. 2013 May;17(3):294-301.
31. Yoshida S, et al. Diffusion tensor imaging of normal brain development. *Pediatr Radiol*. 2013 Jan;43(1):15-27.
32. Russell DJ, et al. Improved scaling of the gross motor function measure for children with cerebral palsy: evidence of reliability and validity. *Phys Ther*. 2000 Sep;80(9):873-85.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em animais com paralisia cerebral, a suplementação de ácido fólico no período pós-natal incentiva alterações morfológicas corticais em fases mais tardias da vida, aumentando a densidade de células neurais nos córtices somatossensorial e motor. Para promover melhora do desenvolvimento neuromotor e acelerar a maturação de parâmetros consolidados antes do desmame, como os reflexos, é provável que seja necessária a suplementação em período mais prolongado e com maior antecedência à fase de maturação dos mesmos. Para isto, são necessários mais estudos que utilizem suplementação também na fase gestacional, além da análise da atividade locomotora dos animais desde o nascimento até fases mais tardias, como aos 60 dias de idade.

REFERÊNCIAS

ACCARDO, J.; KAMMANN, H.; HOON, A.H. JR. Neuroimaging in cerebral palsy. **The Journal of Pediatrics**, v.145, n.2, p.19-27, 2004.

ADLARD, B.; DOBBING, J. Elevated acetylcholinesterase activity in adult rat brain after undernutrition in early life. **Brain Research**, v.9, n.30, p.198-9, 1971.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução RDC nº 269. de 22 de setembro de 2005. [s.l.] ANVISA, 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_269_2005.pdf/2e95553c-a482-45c3-bdd1-f96162d607b3> Acesso em: 08 abr. 2019

ALLEN, N.J.; LYONS, D.A. Glia as an architects of central nervous system formation and function. **Science**, v.362, n.6411, p.181-185, 2018.

ARAÚJO, L.A.; LUCENA, R.C.S. Profile of cerebral palsy in a rehabilitation hospital in Brazil. **Brasília Médica**, v.49, n.4, p.242-249, 2012.

ARNFIELD, E.; GUZZETTA, A.; BOYD, R. Relationship between brain structure on magnetic resonance imaging and motor outcomes in children with cerebral palsy: a systematic review. **Research in Developmental Disabilities**, v.34, n.7, p.2234-2250, 2013.

AZMITIA, E.C. Modern view on an ancient chemical: serotonin effects on proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Research Bulletin**, v.56, p.414-424, 2001.

BALASUBRAMANIAM, J.; XUE, M.; BUIST, R.J.; IVANCO, T.L.; NATIUK, S.; DEL BIGIO, M.R. Persistent motor deficits following infusion of autologous blood into the periventricular region of neonatal rats. **Experimental neurology**, v.197, n.1, p.122-132, 2006.

BARROS, K.M.F.T.; CANON, F.; FREITAS-SILVA, S.R.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; GOUBEL, F. Neonatal malnutrition: effects on contractile and elastic properties on rat soleus muscle. In: Congrès de la Société de Biomécanique, 2004, Creteil-França. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v.112, p.154-154, 2004.

BARUA, S.; CHADMAN, K.K.; KUIZON, S.; BUENAVENTURA, D.; STAPLEY, N.W.; RUOCCO, F.; BEGUM, U.; GUARIGLIA, S.R.; BROWN, W.T.; JUNAID, M.A. Increasing maternal or post-weaning folic acid alters gene expression and moderately changes behavior in the offspring. **PLoS One**, n.9, v.7, 2014.

BAX, M.; GOLDSTEIN, M.; ROSENBAUM, P.; LEVITON, A.; PANETH, N.; DAN, B.; JACOBSSON, B.; DAMIANO, D.; EXECUTIVE COMMITTEE FOR THE DEFINITION OF CEREBRAL PALSY. Proposed definition and classification of

cerebral palsy, April 2005. **Developmental medicine and child neurology**, v.47, n.8, p.571-576, 2005.

BERG, B. **Child Neurology: a clinical manual**. 2nd ed. ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1994.

BLACK, M.M. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. **Food and nutrition bulletin**, v.29, p.126-131, 2008.

BLAIR E. Epidemiology of the cerebral palsies. **The Orthopedic Clinics of North America**, v.41, n.4, p.441-455, 2010.

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

BRITO, V.C.; OLIVEIRA, B.D.R.; MORAES, S.R.A. Effects of immobilization on rat skeletal muscle tissue. **Journal of Morphological Science**, v.28, n.4, p.217-221, 2011.

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

BURDGE, G.C.; LILLYCROP, K.A. Folic Acid supplementation in pregnancy: Are there devils in the detail? **The British Journal of Nutrition**, v.108, n.11, p.1924-1030, 2012.

BYSTRON, I.; BLAKEMORE, C.; RAKIC, P. Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. **Nature Reviews. Neuroscience**, v.9, n.2, p.110-122, 2008.

CHAN, G.; MILLER, F. Assessment and treatment of children with cerebral palsy. **Orthopedic Clinics of North America**, v.45, p.313-325, 2014.

CHUA, C.O.; CHAHBOUNE, H.; BRAUN, A.; DUMMULA, K.; CHUA, C.E.; YU, J.; UNGVARI, Z.; SHERBANY, A.A.; HYDER, F.; BALLABH, P. Consequences of intraventricular hemorrhage in a rabbit pup model. **Stroke**, v.40, n.10, p.3369-3377, 2009.

COLVER, A.; FAIRHURST, C.; PHAROAH, P.O. Cerebral Palsy. **Lancet**, v.383, n.9924, p.1240-1249, 2014.

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

COUTINHO, E.L.; GOMES, A.R.; FRANCA, C.N.; SALVINI, T.F. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, p.1329-1332, 2002.

CRIDER, K.S.; YANG, T.P.; BERRY, R.J.; BAILEY, L.B. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. **Advances in Nutrition**, v.3, n.1, p. 21-38, 2012.

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

DIBELLO, P.M.; DAYAL, S.; KAVETI, S.; ZHANG, D.; KINTER, M.; LENTZ, S.R.; JACOBSEN, D.W. The Nutrigenetics of Hyperhomocysteinemia. **Molecular & Cellular Proteomics**, v.9, n.3, p.471-485, 2010.

DOBBING, J. Undernutrition and the developing brain. **American Journal of Diseases of Children**, v.120, p.411-415, 1970.

EUNSON, P. Aetiology and epidemiology of Cerebral Palsy. **Paediatrics and Child Health**, v.22, p.361-366, 2012.

FOX, W.M. Reflex-ontogeny and behavioral development of the mouse. **Animal Behavior**, v.13, n.2-3, p.234-241, 1965.

GASPAR, P.; CASES, O.; MAROTEAUX, L. The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. **Nature Reviews Neuroscience**, v.4, p.1002-1012, 2003.

GIRARD, S.; KADHIM, H.; LAROUCHE, A.; ROY, M.; GOBEIL, F.; SÉBIRE, G. Pró-inflammatory disequilibrium of the IL-1 beta/IL-1ra ratio in an experimental model of perinatal brain damages induced by lipopolysaccharide and hypoxia-ischemia. **Cytokine**, v.43, n.1, p.54-62, 2008.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; PINAL, C. The developmental origins of adult disease. **Maternal and Child Nutrition**, v.1, n.3, p.130-41, 2005.

GRAMSBERGEN A. Posture and locomotion in the rat: independent or interdependent development? **Neuroscience and Bio behavioral Reviews**, v.22, n.4, p.547-553, 1998.

HENSCH, T.K.; BILIMORIA, P.M. Re-opening Windows: Manipulating Critical Periods for Brain Development. **Cerebrum**, 2012.

HIMMELMANN, K. Epidemiology of cerebral palsy. **Handbook of Clinical Neurology**, v.111, p.163-167, 2013.

HIMMELMANN K, AHLIN K, JACOBSSON B, CANS C, THORSEN P. Risk factors for cerebral palsy in children born at term. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v.90, n.10, p.1070-1081, 2011.

HU, Y.; CHEN, G.; WAN, W.; ZHANG, Z.; ZHI, H.; LIU, W.; QIAN, X.; CHEN, M.; WEN, L.; GAO, F.; LI, J.; ZHAO, L. A rat pupil Model of cerebral palsy induced by prenatal inflammation and hypoxia. **Neural regeneration research**, v.8, n.9, p.817-824, 2015.

HUOT, P.S.; LY, A.; SZETO, I.M.; REZA-LÓPEZ, S.A.; CHO, D.; KIM, Y.I.; ANDERSON, G.H. Maternal and postweaning folic acid supplementation interact to influence body weight, insulin resistance, and food intake regulatory gene expression in rat offspring in a sex-specific manner. **Applied physiology, nutrition and metabolism**, v.41, n.4, p.411-420, 2016.

HUTTON, J.L.; COOKE, T.; PHAROAH, P.O. Life expectancy in children with cerebral palsy. **BMJ**, v.309, n.6952, p.431-435, 1994.

HWANG, S.Y.; SUNG, B.; KIM, N.D. Roles of folate in skeletal muscle cell development and functions. **Archives of Pharmacal Research**, v.42, n.9, p.319-325, 2019.

IBRAHIM, A.H.; BHUTTA, Z.A. Prevalence of early childhood disabilities in a rural district of Sind, Pakistan. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v.55, n.4, p.357-363, 2013.

ITO, P.H. **Avaliação Comportamental de ratos submetidos à Anóxia neonatal**. Dissertação (Mestrado em Psicologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

JAMON, M.; CLARAC, F. Early walking in the neonatal rat: a kinematic study. **Behavioral Neuroscience**, v.112, n.5, p.1218–1228, 1998.

JONES, M.W.; MORGAN, E.; SHELTON, J.E; THOROGOOD, C. Cerebral Palsy: Introduction and Diagnosis (Part I). **Journal of Pediatric Health Care**, v.21, n.3, p.146-152, 2007.

KANNAN, S.; SAADANI-MAKKI, F.; BALAKRISHNAN, B.; CHAKRABORTY, P.; JANISSE, J.; LU, X.; MUZIK, O.; ROMERO, R.; CHUGANI, D.C. Magnitude of [(11)C]PK11195 binding is related to severity of motor deficits in a rabbit model of cerebral palsy induced by intrauterine endotoxin exposure. **Developmental Neuroscience**, v.33, n3-4, p.231-240, 2011.

KOLB, B.; GIBB, R. Brain plasticity and behaviour in the developing brain. **Journal of the Canadian Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v.20, n.265–276, 2011.

KOLB, B.; GIBB, R.; ROBINSON, T. E. Brain Plasticity and Behavior. **Current Directions in Psychological Science**, v.12, n.1, p.1–5, 2003.

KOMAN, L.A.; SMITH, B.P.; SHILT, J.S. Cerebral Palsy. **The Lancet**, v.363, p.1619-1631, 2004.

KOOHPEYMA, H.; GOUDARZI, I.; SALMANI, M.E.; LASHKARBOLOUKI, T.; SHABANI, M. Postnatal Administration of Homocysteine Induces Cerebellar Damage in Rats: Protective Effect of Folic Acid. **Neurotoxicity Research**, v.35, n.3, p.724-738, 2019.

KRIGGER, K.W. Cerebral palsy: An overview. **American Family Physician**, v.73, n.1, p.91-100, 2006.

KUMAR, A.J.; MOTTA-TEIXEIRA, L.C.; TAKADA, S.H.; YONAMINE-LEE, V.; MACHADO-NILS, A.V.; XAVIER, G.F.; NOGUEIRA, M.I. Behavior, cognitive and histological changes following neonatal anoxia: Male and female rats1 differences at adolescent age. **International Journal of Developmental Neuroscience**, n.73, p.50-58, 2019.

KUPERMAN, A. S. Effects of acrylamide on the central nervous system of the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v.9, n.1, p.1-7, 2013.

LACERDA, D. C.; FERRAZ-PEREIRA, K. N.; VISCO, D. B.; PONTES, P.B.; CHAVES, W.F.; GUZMÁN-QUEVEDO, O.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; TOSCANO, A.E. Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats. **Physiology and Behavior**, v.173, p.69-78, 2017.

LALONDE, R.; JOYAL, C.C.; BOTEZ, M.I. Effects of folic acid and folinic acid in cognitive and motor behaviours in 20-month-old rats. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v.44, p.703-707, 1993.

LEE, J.H.; LEE, Y.A.; OH, K.H.; CHANG, N. Effects of dietary folic acid on the expression of myelin basic protein in the brain and spinal cord of pregnant and lactating rats. **Annals of nutrition & Metabolism**, n.56, v.2, p.83-90, 2010.

LEKIC, T.; MANAENKO, A.; ROLLAND, W.; TANG, J.; ZHANG, J.H. A novel preclinical model of germinal matrix haemorrhage using neonatal rats. **Acta Neurochirurgica. Supplement.**, v.111, p.55-60, 2011.

LIPTON, S.A.; KATER, S.B. Neurotransmitter regulation of neuronal outgrowth, plasticity and survival. **Trends in Neurosciences**, v.12, p.265-270, 1989.

LIU, Y.; RAO, M.S. Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. **Biology of the Cell**, v.96, n.4, p.279-290, 2004.

LUBICS, A.; REGLODI, D.; TAMÁS, A.; KISS, P.; SZALAI, M.; SZALONTARY, L.; LENGVÁRI, I. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to

neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behavioral Brain Research**, v.157, n.1, p.157-165, 2005.

MACHADO, V.; PIMENTEL, S.; PINTO, F.; NONA, J. Perinatal ischemic stroke: a five-year retrospective study in a level-III maternity. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 1, p. 65–71, 2015.

MACLENNAN, A.H., THOMPSON, S.C., GECZ, J. Cerebral Palsy: Causes, pathways, and the role of genetic variants. **The American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.213, n.6, p.779-788, 2015.

MANABAT, C.; HAN, B. H.; WENDLAND, M.; et al. Reperfusion differentially induces caspase-3 activation in ischemic core and penumbra after stroke in immature brain. **Stroke**, v. 34, n. 1, p. 207–213, 2003.

MANCINI, M.C.; FIÚZA, P.M.; REBELO, J.M.; MAGALHÃES, L.C.; COELHO, Z.A.C.; PAIXÃO, M.L.; GONTIJO, A.P.B.; FONSECA, S.T. Comparison of functional activity performance in normally developing children and children with cerebral palsy. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.60, n.2B, p.446-452, 2002.

MARCUZZO, S.; DUTRA, M.F.; STIGGER, F.; DO NASCIMENTO, P.S.; ILHA, J.; KAIL-GASPAR, P.I.; ACHAVAL, M. Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: Walking pattern and soleus quantitative histology. **Brain Research**, v.1222, p.129-140, 2008.

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

MARQUES, M. R.; STIGGER, F.; SEGABINAZI, E.; AUGUSTIN, O.A.; BARBOSA, S.; PIAZZA, F.V.; ACHAVAL, M.; MARCUZZO, S. Beneficial effects of early environmental enrichment on motor development and spinal cord plasticity in a rat model of cerebral palsy. **Behavioural Brain Research**, v.263, p.149–157, 2014.

MATTÉ, C.; SCHERER, E.B.S.; STEFANELLO, F.M.; BARSCHAK, A.G.; VARGAS, C.R.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T.S. Concurrent folate treatment prevents Na⁺,K⁺ - ATPase activity inhibition and memory impairments caused by chronic hyperhomocysteinemia during rat development. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.25, n.8, p.545-552, 2007.

MATTOS DELLA LUCIA, C.; RODRIGUES DA SILVA, E.; RIBEIRO, S.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.; BRANDÃO, S. Optimization of method to analyze folate in leafy vegetables by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Química Nova**, v.34, n. 2, p.335-340, 2011.

MILLER, A.L. The Methylation, Neurotransmitter, and Antioxidant Connections Between Folate and Depression. **Alternative Medicine Review: a journal of clinical therapeutic**, v.13, n.3, p.213-226, 2008.

MIYATA, K.; MIYATA, T.; NAKABAYASHI, K.; OKAMURA, K.; NAITO, M.; KAWAI, T.; TAKADA, S.; KATO, K.; MIYAMOTO, S.; HATA, K.; ASAHARA, H. DNA methylation analysis of human myoblasts during *in vitro* myogenic differentiation: *de novo* methylation of promoters of muscle-related genes and its involvement in transcriptional down-regulation. **Human Molecular Genetics**, v.24, n.2, p.410-423, 2015.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, v.17, p.91-128, 1993.

MUKAI, T.; MORI, Y.; SHIMAZU, T.; TAKAHASHI, A.; TSUNODA, H.; YAMAGUCHI, S.; KIRYU, S.; TOJO, A.; NAGAMURA-INOUE, T. Intravenous injection of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells attenuates reactive gliosis and hypomyelination in a neonatal intraventricular hemorrhage model. **Neuroscience**, v.355, p.175-187, 2017.

NASSER, C.; NOBRE, C.; MESQUITA, S.; RUIZ, J.G.; CARLOS, H.R.; PROUVOT, L.; YACUBIAN, E.M.T. Semana da Conscientização sobre a importância do ácido fólico. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v.11, n.4, p.199-203, 2005.

NGUYEN, A.T.; ARMSTRONG, E.A.; YAGER, J.Y. Neurodevelopmental reflex testing in neonatal rat pups. **Journal of Visualized Experiments**, n.122, 2017.

OSKOUI, M.; COUTINHO, F.; DYKEMAN, J.; JETTÉ, N.; PRINGSHEIM, T. An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v.55, p.509-519, 2013.

PAPAKOSTAS, G.I.; SHELTON, R.C.; ZAJECKA, J.M.; ETEMAD, B.; RICKELS, K.; CLAIN, A.; BAER, L.; DALTON, E.D.; SACCO, G.R.; SCHOENFELD, D.; PENCINA, M.; MEISNER, A.; BOTTIGLIERI, T.; NELSON, E.; MISCHOULON, D.; ALPERT, J.E.; BARBEE, J.G.; ZISOOK, S.; FAVA, M. L-methylfolate as adjunctive therapy for SSRI-resistant major depression: results of two randomized, double-blind, parallel-sequential trials. **The American Journal of Psychiatry**, v.169, n.12, p.1267-1274, 2012.

PATANWALA, I.; KING, M.J.; BARRETT, D.A.; ROSE, J.; JACKSON, R.; HUDSON, M.; PHILO, M.; DAINITY, J.R.; WRIGHT, A.J.; FINGLAS, P.M.; JONES, D.E. Folic Acid handling by the human gut: implications for food fortification and supplementation. **The American journal of clinical nutrition**, v.100, n.2, p.593-599, 2014.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain on Stereotaxic Coordinates**. 6th ed. ed. Academic Press, 2006.

PEREA, G; ARAQUE, A. GLIA modulates synaptic transmission. **Brain Research Reviews**, n.63, p.93-102, 2010.

PERENC, L.; PRZYSADA, G.; TRZECIAK, J. Cerebral Palsy in Children as a risk factor for malnutrition. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.66, n.4, p.224-232, 2015.

REBEL, M. F.; RODRIGUES, R. F.; CORRÊA, C. L. Motor Prognosis and Current Perspectives in cerebral palsy. **Journal of Human growth and development**, v.20, n.2, p.342–350, 2010.

RENOLLEAU, S.; AGGOUN-ZOUAOU, D.; BEN-ARI, Y.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. **Stroke; a journal of cerebral circulation**, v. 29, n. 7, p. 1454–60; discussion 1461, 1998.

REVAKOVA, T.; REVAK, O.; VASILENKOVA, A.; BEHULOVA, D.; BRUCKNEROVA, I. Amount of folic acid in different types of nutrition used in neonatal period. **Bratislavske Lekarske Listy**, v.116, n6, p.349-353, 2015.

REYNOLDS, E.H. Methylfolate as adjunctive treatment in major depression. **The American Journal of Psychiatry**, v.170, n.5, p.560, 2013.

REYNOLDS, E.H. The neurology of folic acid deficiency. **Handbook of clinical neurology**, v.120, p.927-943, 2014.

RIBEIRO, L.C.; DEVINCENZI, M.U.; VIANA, E.C.; CASTRO, T.G.; SIGULEM, D.M. Ácido fólico: sua importância em situações fisiológicas do ciclo vital. São Paulo: Editora de Projetos Médicos; 2002.

RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v.108, n.SUPPL. 3, p.511–533, 2000.

RICHARDS, C.L.; MALOUIN, F. Cerebral palsy: definition, assessment and rehabilitation. **Handbook of Clinical Neurology**, v.111, p.183-195, 2013.

ROBINSON, S.; PETELENZ, K.; LI, Q.; COHEN, M.L.; DECHANT, A.; TABRIZI, N.; BUCEK, M.; LUST, D.; MILLER, R.H. Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic-ischemic insults in rats. **Neurobiology of diseases**, v.18, n.3, p.568-581, 2005.

ROSENBAUM, P.; PANETH, N.; LEVITON, A.; GOLDSTEIN, M.; BAX, M.; DAMIANO, D.; DAN, B.; JACOBSSON, B. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v.109, p.8-14, 2007. Erratum in: *Developmental Medicine and Child Neurology*, v.49, n.6,

p.480, 2007.

ROUSSET, C. I.; KASSEM, J.; AUBERT, A.; PLANCHENAULT, D.; GRESSENS, P.; CHALON, S.; BELZUNG, C.; SALIBA, E. Maternal exposure to lipopolysaccharide leads to transient motor dysfunction in neonatal rats. **Developmental Neuroscience**, v.35, n.2–3, p.172–181, 2013.

SAADANI-MAKKI, F.; KANNAN, S.; LU, X.; JANISSE, J.; DAWE, E.; EDWIN, S.; ROMERO, R.; CHUGANI, D. Intrauterine administration of endotoxin leads to motor deficits in a rabbit model: a link between prenatal infection and cerebral palsy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.199, n.6, p.651.e1-7, 2008.

SACHDEV, P. Homocysteine and neuropsychiatric disorders. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 26, n.1, p.50-56, 2004.

SANGER, T.D; DELGADO, M.R.; GAEBLER-SPIRA, D.; HALLET, M.; MINK, J.W. Task Force on Childhood Motor Disorders. Classification and definition of disorders causing hypertonía in childhood. **Pediatrics**, V.111, n.1, p.89-97, 2003.

SEMPLE, B.D.; BLOMGREN, K.; GIMLIN, K.; FERRIERO, D.M.; NOBLE-HAEUSSLEIN, L.J. Brain development in rodent and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, n106-107, p.1-16, 2013.

SENGPIEL, F. The critical period. **Current Biology**, v.17, n.17, p.42-43, 2007.

SILVA, H.J.; MARINHO, S.M.O.C.; SILVA, A.E.T.M.S.; ALBUQUERQUE, A.G.; MORAES, S.R.A.; CASTRO, R.M. Protocol of mensuration to avaliation of indicators of somatic development of Wistar rats. **International Journal of Morphology**, v.23, n.3, p.227-230, 2005.

SILVA, K.O.; PEREIRA, S.C.; PORTOVEDO, M.; MILANSKI, M.; GALINDO, L.C.; GUZMÁN-QUEVEDO, O.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; TOSCANO, A.E. Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.52, p.38–45, 2016.

SMART, J.L; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. II: Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. **Brain Research**, v.28, n.1, p.85–95, 1971.

STAVSKY, M.; MOR, O; MASTROLIA, S. A.; GREENBAUM, S.; THAN, N.G.; EREZ, O. Cerebral Palsy – Trends in Epidemiology and recent development in prenatal mechanisms of disease, treatment, and prevention. **Frontiers in Pediatrics**, v.5, p.1-10, 2017.

STEARNS, S.; DE JONG, G.; NEWMAN, B. The effects of phenotypic plasticity on genetic correlations. **Trends in Ecology and Evolution**, v.6, n.4, p.122–126, 1991.

STIGGER, F.; FELIZZOLA, A.L.; KRONBAUER, G.A.; COUTO, G.K.; ACHAVAL, M.; MARCUZZO, S. Effects of fetal exposure to lipopolysaccharide, perinatal anoxia and sensorimotor restriction on motor skills and musculoskeletal tissue: implications for an animal model of cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v.228, n.2, p.183-191, 2011.

STIPURSKY, J.; ROMÃO, L.; TORTELLI, V.; MOURA NETO, V.; GOMES, F.C.A. Neuron-glia signaling: Implications for astrocyte differentiation and synapse formation. **Life Science**, v.89, p. 524-531, 2011.

STOKNES, M.; ANDERSEN, G.L.; ELKAMIL, A.J.; IRGENS, L.M.; SKRANES, J.; SALVESEN, K.A.; VIK, T. The effects of multiple pre- and perinatal risk factors on the occurrence of cerebral palsy. A Norwegian register based study. **European Journal of paediatric neurology**, v.16, n.1, p.56-63, 2011.

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

STREJA, E.; MILLER, J.E.; BECH, B.H.; GREENE, N.; PEDERSEN, L.H.; YEARGININ-ALLSOPP, M.; VAN NAARDEN BRAUN, K.; SCHENDEL, D.E.; CHRISTENSEN, D.; ULDALL, P.; OLSEN, J. Congenital cerebral palsy and prenatal exposure to self-reported maternal infections, fever, or smoking. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.209, n.4, p.332.e1-332.e10, 2013.

SWERDLOW, N.; GEYER, M. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. **Schizophrenia Bulletin**, v.24, n.2, p.285–301, 1998.

TAKADA, S.H.; SAMPAIO, C.A.G.; ALLEMANDI, J.; ITO, P.H.; TAKASE, L.F.; NOGUEIRA, M.I. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Methods**, v.198, p.62-69, 2011.

TAU, G.Z.; PETERSON, B.S. Normal Development of Brain Circuits. **Neuropsychopharmacology**, v.35, n.1, p.147-168, 2010.

TCHANTCHOU, F.; SHEA, T.B. Folate deprivation, the methionine cycle, and Alzheimer's disease. **Vitamins and Hormones**, v.70, p.83-97, 2008.

TUCKER, D.M.; POULSEN, C.; LUU, P. Critical periods for the neurodevelopmental processes of externalizing and internalizing. **Development and Psychopathology**, v. 27, n.2, p.321-346, 2015.

UEHARA, S.K.; ROSA, G. Association between folic acid deficiency and disease and prevention strategies: a critical view. **Revista de Nutrição**, v.23, n.5, p.881-884, 2010.

VALERA-GRAN, D.; GARCÍA DE LA HERA, M; NAVARRETE-MUÑOZ, E.M.; FERNANDEZ-SOMOANO, A.; TARDÓN, A.; JULVEZ, J.; FORNS, J.; LERTXUNDI, N.; IBARLUZEA, J.M.; MURCIA, M.; REBAGLIATO, M.; VIOQUE, J. Folic Acid supplements during pregnancy and child psychomotor development after the first year of life. **JAMA Pediatrics**, v.166, n.11, 2014.

VAN DE BERG, W. D. J.; BLOKLAND, A.; CUELLO, A. C.; SCHMITZ, C.; VREULS, W.; STEINBUSCH, H.W.; BLANCO, C.E. Perinatal asphyxia results in changes in presynaptic bouton number in striatum and cerebral cortex — a stereological and behavioral analysis. *Journal of chemical neuroanatomy*, v.20, n.1, p. 71–82, 2000.

VANNUCCHI, H.; MONTEIRO, T.H. . Ácido Fólico. In: ILSI Brasil- International Life Sciences Institute do Brasil. (Org.). *Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes*. São Paulo: ILSI, 2010, v. 10, p. 3-22.

WANG, X., ROUSSET, C.I., HAGBERG, H., MALLARD, C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v.11, n.5, p.343-353, 2006.

WEE, A. K. Serum folate predicts muscle strength: a pilot cross-sectional study of the association between serum vitamin levels and muscle strenght and gait measures in patients >65 years old with diabetes mellitus in a primary care setting. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 1, p. 89, 2016.

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

WILSON, M.D. Animal Models of cerebral palsy: Hypoxic brain injury in the newborn. **Iranian Journal of child neurology**, v.9, n.2, p. 9-16, 2015.

ZEHR, E. P.; STEIN, R. B. What functions do reflexes serve during human locomotion? **Progress in Neurobiology**, v.58, n.2, p.185–205, 1999.

**APÊNDICE A – ARTIGO EM PROCESSO DE PUBLICAÇÃO NA REVISTA
EXPERIMENTAL NEUROLOGY**

Neonatal treatment with folic acid increases the number of neural cells of specific cortex areas in rat model of cerebral palsy.

Kássia de Oliveira Gomes da Silva^a, Raul Manhães-de-Castro^b, Emanuel Ewerton Mendonça Vasconcelos^c, Marília Ezaquiel Souza-Silva^c, Ana Elisa Toscano^d

^aPost Graduate Program in Neuropsychiatry and Behavior Sciences, Federal University of Pernambuco, 50740-600 Recife, PE, Brazil. kassiaoliveira17@yahoo.com.br

^bDepartment of Nutrition, Federal University of Pernambuco, 50670-301 Recife, PE, Brazil.

^cGraduation in Physiotherapy, Federal University of Pernambuco, 50740-560 Recife, Brazil.

^dDepartment of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, 55608-680 Vitória de Santo Antão, Brazil. aeltoscano@yahoo.com.br

Corresponding Author:

Ana Elisa Toscano

Department of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco (UFPE) – Rua Alto do Reservatório, s/n, Bela Vista, 55608-680 – Vitória de Santo Antão, PE, Brazil. Telephone: +55 081 3523-3351. E-mail: aeltoscano@yahoo.com.br

Cerebral palsy is a non-progressive neurological disorder that modifies motor functions and delays somatic growth and maturation of reflexes. It has a global prevalence of 2.1 children per thousand live births, being higher in underdeveloped countries. Folic acid, a vitamin that is part of the B complex, acts on various physiological reactions, including the formation of new cells, the formation of neurotransmitters, and synthesis and repair of myelin. The objective of the study was to evaluate the effects of folic acid supplementation on physical features, somatic maturation, reflex ontogenesis and number of neurons and glial cells in the somatosensory (S1) and motor (M1) cortex of rats submitted to the experimental model of cerebral palsy. The experimental study consisted of 63 male Wistar rats distributed among the following groups: Control Saline (n=14), Control Folic Acid (n=15), Cerebral Palsy (n=17), Cerebral Palsy Folic Acid (n=17). Folic acid supplementation was performed from the first to the 21st day, subcutaneously on the back of the animal using a dose of 5 mg/kg body weight. Saline animals received 0.9% Sodium Chloride (NaCl) solution also subcutaneously. Somatic growth was evaluated on the 1st day and from the 3rd day it was reevaluated with an interval of 3 days until the 21st day. The maturation of the physical characteristics and the ontogenesis of reflexes were evaluated daily until their complete appearance. On the 29th day, the animals were euthanized and the brain was removed for histological analysis of the S1 and M1 cortices. The comparison of means was performed by ANOVA Two Way and Kruskal-Wallis tests. Cerebral palsy reduced body weight and somatic growth, as well as caused the delayed opening of the ear canal, opening of the eyes and delayed reflexes of free-fall righting, negative geotaxis and auditory startle, without the influence of folic acid supplementation in any one of the parameters. However, in individuals with cerebral palsy, folic acid supplementation increased the number of glial cells in the S1 cortex, and in M1 cortex folic acid supplementation increased the number of neurons and glial cells. The data suggest that supplementation of folic acid in the postnatal period in experimental cerebral palsy seems to exert more effects after the lactation period, increasing the number of neurons and/or glial cells in the histological analysis of the cerebral cortex, corresponding to the period of improvement and maturation of neural circuits in these animals.

Keywords: Cerebral Palsy; Folic acid; Nervous system; Neural cells; Reflex ontogeny; Rat.

Introduction

During the formation of the individual, there are more sensitive and specific periods in which the organism undergoes important modifications in its structure and function, occurring cellular events such as neurogenesis, angiogenesis, gliogenesis, migration and cell differentiation (Dobbing, 1970; Morgane et al., 1993). These periods are considered critical for development of the nervous system and range from the formation of the individual in the gestational phase to the first years of life (Dobbing, 1970; Morgane et al., 1993; Sengpiel, 2007; Tucker et al., 2015). The ability of the nervous system to alter its organization and function of expressing different phenotypes through individual experiences and the influence of the environment is called neuroplasticity (Stearns et al., 1991; Kolb et al., 2003; Gluckman et al., 2005). Some parts of the brain, such as the cerebral cortex, are potentially more plastic (Kolb et al., 2003). This is made up of six different cell layers, which differentiate into neurons when they reach their designated site (Kolb and Gibb, 2011).

Although folic acid (or folate) is widely used and known for its importance in the gestational phase, it is a micronutrient that is part of the B vitamins (Nasser et al., 2005; Crider et al., 2012), which is important for the functioning of the nervous system at all ages and requires a minimum amount also needed in neonates, infants and children (Sachdev, 2004; Miller, 2008; Tchantchou and Shea, 2008; Vannucchi and Monteiro, 2010). At the cellular level, folate acts as a cofactor of several physiological reactions, relating to various biochemical processes of growth and development due to its role in the synthesis, repair, intracellular DNA methylation, contributing to the formation of new cells and new tissues, and regulation of gene expression. It is also related to the biosynthesis and metabolism of amino acids and nucleotides, synthesis of neurotransmitters and synthesis and repair of myelin, formation of red blood cells and cardiovascular health (Miller, 2008; Vannucchi and Monteiro, 2010; Burdge and Lillycrop, 2012; Reynolds, 2014; Hwang et al., 2019). Therefore, folic acid has a synergistic interaction and an important role in the development of the central nervous system (Miller, 2008; Tchantchou and Shea, 2008; Uehara and Rosa, 2010).

Cerebral Palsy (CP) is a complex syndrome that comprises a group of permanent movement and posture disorders that cause functional limitation due to disturbances occurring in the central nervous system of the developing fetus or child (Rosenbaum et al., 2007; Bax et al., 2005). It is considered the most common cause of chronic motor dysfunction in childhood

(Colver et al., 2014), with a global prevalence of 2.1 children per 1000 on average (Oskoui et al., 2013; Stavsky et al., 2013). Patients with CP present increased reflexes, spasticity, hypertonicity, musculoskeletal malformations, atrophy, muscle weakness, lack or decreased coordination of movements, poor balance and gait changes (Richards and Malouin, 2013; Krigger, 2006). These patients exhibit alterations in the projection of motor cortex neurons to spinal cord motoneurons (Richards and Malouin, 2013), resulting in an inability to control motor functions due to a reduction in the number of effective motor units (Jones et al., 2007; Koman et al., 2004).

In the present study, we used the model that associates perinatal anoxia with sensory-motor restriction. Initially proposed by Strata et al. (2004) and followed by Coq et al. (2008), this experimental model of cerebral palsy acts directly on brain plasticity, promoting insults precisely during the critical period of brain development, promoting alterations in neuromotor development and in neurological tissues (Marcuzzo et al., 2010; Marques et al., 2014; Silva et al., 2016; Lacerda et al., 2017). Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of folic acid supplementation in the postnatal period on somatic growth, physical features, reflex ontogeny and morphology of the somatosensory and motor cortex of rats submitted to the experimental model of cerebral palsy.

Materials and Methods

Animals and experimental groups

Male Wistar rats were used, divided in four experimental groups: Control Saline (CS, n=14), Cerebral Palsy Saline (CPS, n=17), Control Folic Acid (CFA, n=15) and Cerebral Palsy Folic Acid (CPFA, n=17). Pups in the saline group or folic acid group received sterilized saline (Sodium chloride, NaCl, 0.9%, 10 µl/g) or folic acid (Sigma, dissolved in saline solution in a concentration of 50 mg folic acid/100 ml NaCl, 5 mg/kg, 10 µl/g), respectively, once a day by subcutaneous way (adapted to Matté et al., 2007; and Lalonde et al., 1993). Saline and folic acid injections were applied daily, from first to 21st day of life. At 25th day of life, they were separated from mother and allocated in cages with one to four animals per cage from the same group. The animals were kept in an experiment room with a temperature of 22°C, in an inverted cycle of constant light (dark from 08:00 to 20:00, light from 20:00 to 08:00) and free access water and food all the time of the experiment. All stages

of the study were approved by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco under the number 0016/2018.

Experimental model of Cerebral Palsy

For the experimental model of cerebral palsy, the pups were submitted to two episodes of postnatal anoxia, one on the day of birth and the second day of life. For this, in each episode of anoxia, the animals were housed inside a glass chamber partially immersed in water at 37°C and exposed to nitrogen (100%) at 9 L/min for 12 minutes (Strata et al., 2004). From the second to the 28th postnatal day, the sensorimotor restriction was performed for 16 hours per day (11 hours of restriction in the clear cycle period). In the remaining 8 hours, the free movement of the animal was allowed and the experimental evaluations were performed. For sensorimotor immobilization, an epoxy mold was used that allowed only limited hip joint movements, leaving the hind limbs extended, without damage in eliminating urine and feces and maternal care (Strata et al., 2004).

Somatic Growth Analysis

Each animal was evaluated on days 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 at 2:00 p.m., using a digital calliper rule, for the following measures in centimeters (cm) (Silva et al., 2005): Laterolateral and anteroposterior axis of the skull and longitudinal axis. The body weight of each pup, in grams (g), was recorded daily up to the 21st day.

Evaluation of Maturation of physical features and ontogenesis of reflexes

The maturation of physical features (opening of the auditory pavilion, opening of the auditory canal, eruption of the lower and upper incisors and opening of the eyes), each animal was analyzed daily at 2:00 p.m., recording the time in days from birth to maturation of the assessed physical feature (Smart and Dobbing, 1971).

The following reflexes were evaluated (Soares et al., 2014): palmar grasp, righting reflex, vibrissae placing, cliff avoidance, negative geotaxis, auditory startle and free-fall righting. For each reflex, the day of consolidation was considered the first day of the sequence of three consecutive days of the complete appearance of the expected reflex response. The response of each reflex was considered for a maximum evaluation period of 10 seconds.

Histomorfometric analysis of the cerebral cortex

The animals were deeply anesthetized with ketamine (60 mg/kg body weight) and xylazine (7.5 mg/kg BW) for transcardial perfusion on the 29th day postnatal life. After opening the chest cavity, a cannula for infusion was introduced into the left ventricle. This cannula was coupled to a peristaltic pump driven at a speed compatible with maintaining the integrity of the blood vessels. 150 ml of saline solution (NaCl, 0.9%) buffered with phosphate buffer and 200 ml of fixative solution (4% paraformaldehyde) were infused. Then, the brains were removed from the skull, postfixed in the same overnight fixative solution, and then immersed in sucrose solution (30%) for approximately 48 hours. Coronal sections of the brain of 20µm thickness were performed with a cryostat. The sections of the brain were stained with Cresyl Violet and the slides were captured and scanned at 40x. The cerebral images were analyzed to identify the areas of representation of the posterior limb in somatosensory cortex (S1) and motor cortex (M1) through stereotactic coordinates (-0.60 mm to - 2.28 mm of bregma for S1; 3.0 to 0 mm of bregma for M1; Paxinos and Watson, 2006). For each rat, neurons and glial cells of layer 5 of the cortex (corresponding to large pyramidal neurons of easy visualization) were counted per unit area (200 µm x 200 µm) in 10 fields in each cut (five in the left hemisphere and five in the right hemisphere). The area and perimeter of the neurons and glia, as well as the glia-neuron index, were evaluated. The glia-neuron index was calculated as the ratio of glial cells by neurons in each field (adapted from Marcuzzo et al., 2010).

Statistical analysis

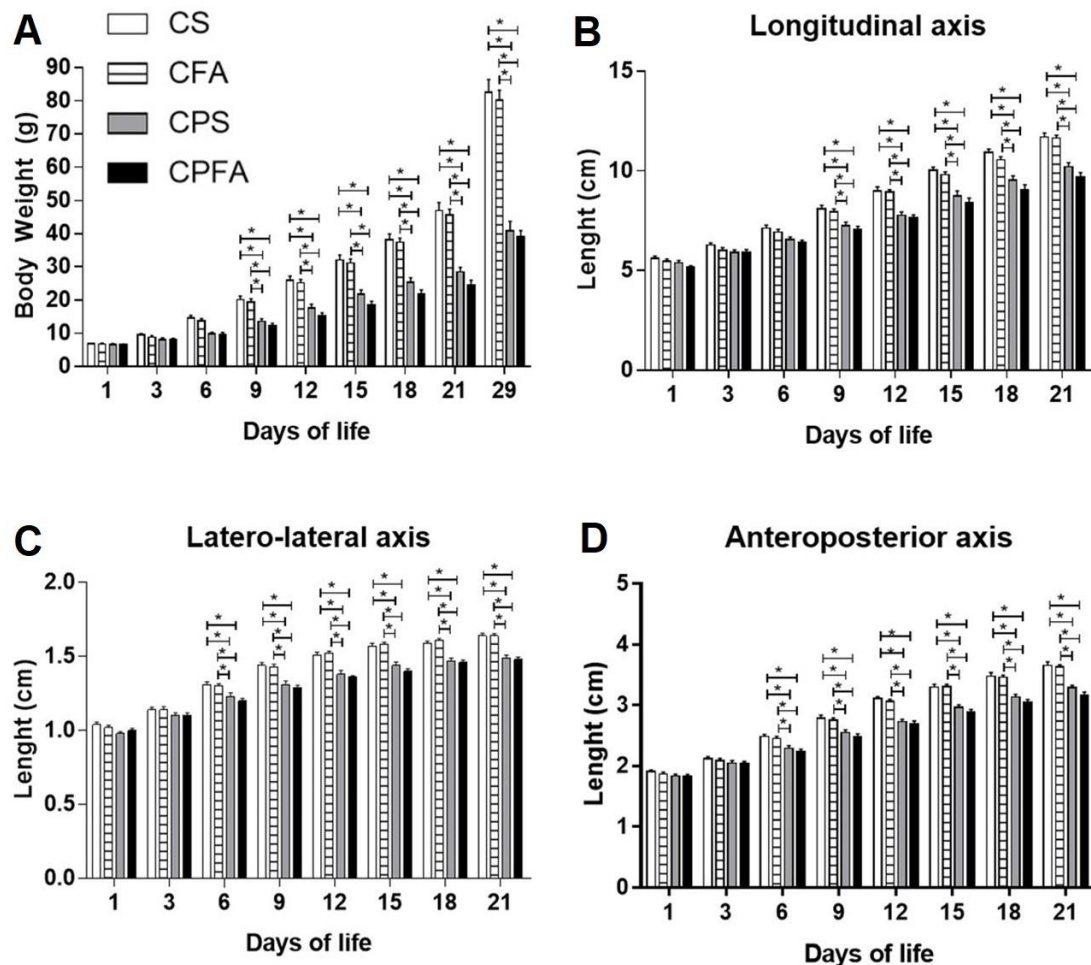
Two-Way ANOVA Repeated Measures (RM) followed by the Bonferroni Post-Test was used for the analysis of somatic growth data. For the maturation of physical features and development of reflexes, the Kruskal-Wallis test was used followed by the Dunns' multiple comparisons post-test. Two-way ANOVA followed by the Tukey post-test was used for the analysis of neurons and glial cells. The results are expressed as mean $\pm$ standard error, and the significance level used was 5% ($p < 0.05$).

Results

Somatic growth

At birth, the body weight and length of the longitudinal axis of the animals were similar between groups and continued until the 6th day of postnatal life. From the 9th day postnatal life, the animals in the Cerebral Palsy groups (CPS and CPFA) presented lower body weight and longitudinal axis in relation to the Control (CS and CFA) groups ($p < 0.05$). No influence of neonatal folic acid treatment on body weight and longitudinal axis were identified between the experimental groups (Fig. 1A and 1B).

In relation to the laterolateral and anteroposterior axes, from the 6th day postnatal life, the CPS and CPFA groups presented lower values in relation to the CS group ($p < 0.05$). Similarly, the CPS and CPFA groups decreased the laterolateral and anteroposterior axes in relation to the CFA group ($p < 0.05$). There was also no influence of neonatal treatment with folic acid on the laterolateral and anteroposterior axes between the groups studied (Fig. 1C and 1D).



Groups								
	CS (n=14)		CFA (n=17)		CPS (n=15)		CPFA (n=17)	
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	Median	Min-Max	Median	Min-Max
Physical Features								
Opening of the auditory pavilion	2,5	1-4	3	1-4	3	2-5	3	2-4
Opening of the auditory canal	12	10-14	12	10-14	14 ^{ab}	11-17	14 ^{ab}	12-17
Opening of the eyes	14	12-16	14	13-15	15 ^{ab}	13-17	15 ^{ab}	13-18
Eruption of the upper incisors	9,5	7-12	8	8-12	9	8-13	10	8-13
Eruption of the lower incisors	11	9-15	11	9-16	12	9-15	12	10-15
Reflexes								

Palmar grasp	3,5	1 – 7	3	1-6	3	1-7	3	1-9
Righting reflex	3	1-6	2	1-7	4	2-8	3	1-8
Cliff avoidance	7	6-9	6	4-9	8	6-10	8	6-10
Vibrissae placing	6	3-12	6	3-12	8	3-13	8	3-13
Free-fall righting	13	10-14	13	10-16	15 ^{ab}	13-18	16 ^{ab}	13-18
Negative geotaxis	12	10-13	12	10-13	18 ^{ab}	12-18	17 ^{ab}	12-18
Auditory startle	12	10-14	12	10-14	14 ^{ab}	11-17	14 ^{ab}	12-17

Table 1. Physical features and ontogenesis of reflexes in all groups. CS = Control Saline group (n=14); CFA = Control Folic Acid group (n=17); CPS = Cerebral Palsy Saline group (n=15); CPFA = Cerebral Palsy Folic Acid group (n=17). The data are shown as median, minimum and maximum days values. Kruskal-Wallis analysis of variance followed by Dunn's test. ^aP<0,05 versus CS group; ^bP<0,05 versus CFA group.

Neurons and glia in the somatosensory and motor cortex

Neurons were identified by their generally larger size and non-spherical contour (triangular shape), presence of Nissl granules in the cytoplasm and pale nucleus with nucleoli, whereas glial cells were identified by their spherical aspect, smaller size and absence of stained cytoplasm. Fig. 2 shows representative photomicrographs of the neurons and glia cells in the layer V of the S1 (left column) and M1 (right column) cortices from all groups.

Tables 2 and 3 show the values of the number of neurons and glial cells by area, the neuronal area and perimeter, and the glia/neuron index of cortex S1 and M1, respectively, for each group.

In the S1 cortex, the number of glial cells reduced in the CPS group comparing with CS and CFA groups. Neonatal treatment with folic acid in cerebral palsy (CPFA group) increased the number of glial cells, raising it to a number of cells similar to those in the control groups (p<0,05).

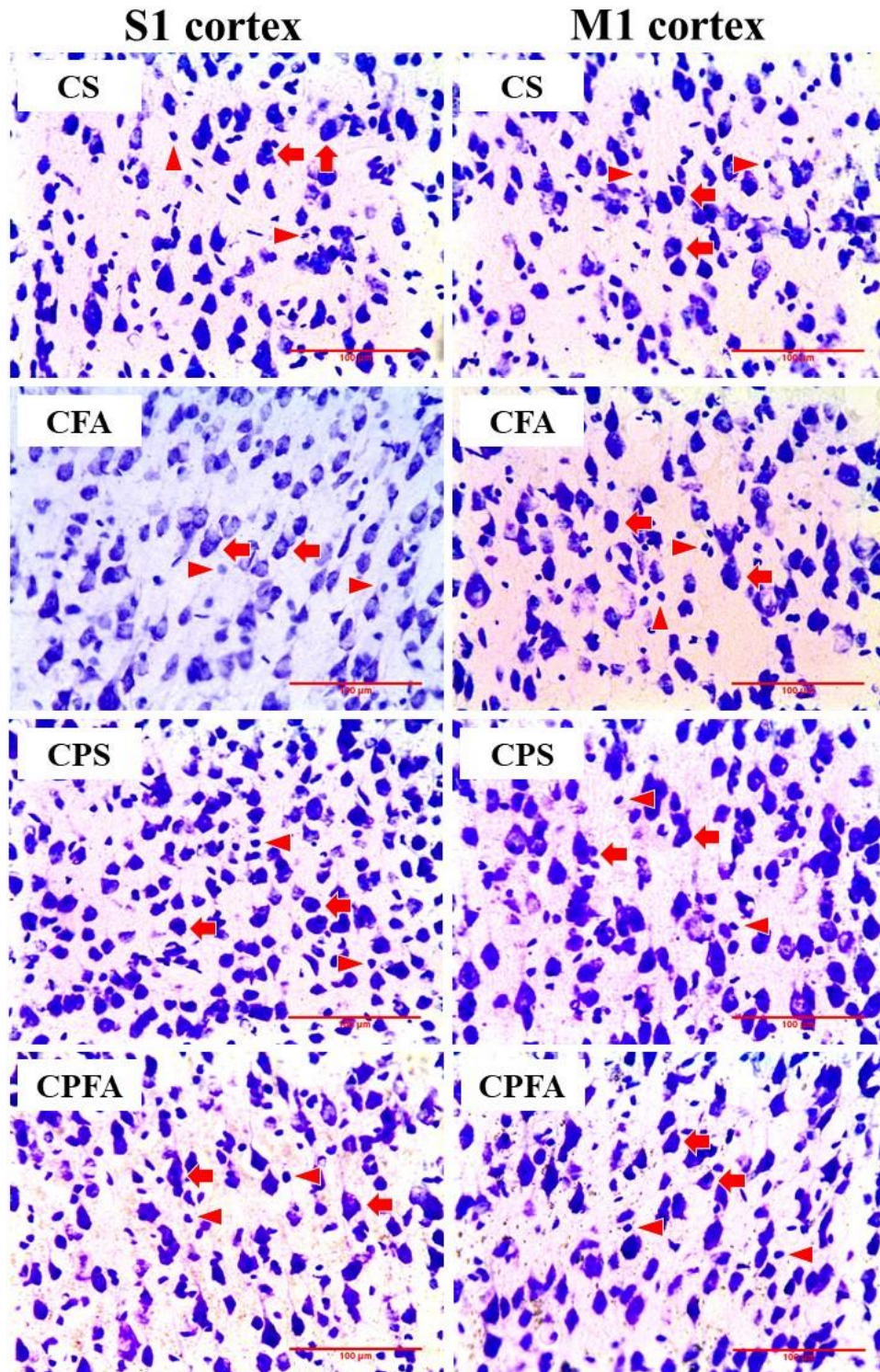


Figure 2: Representative images stained with Cresyl Violet scanned at 40x showing the layer V of the hind-limb representation area of somatosensory (left) and motor (right) cortex of CS (Control Saline; n=14), CFA (Control Folic Acid group; n=17), CPS (Cerebral Palsy Saline; n=15) and CPFA (Cerebral Palsy Folic Acid; n=17) groups. Arrows indicate neurons while arrowheads indicate glial cells. Scale bar = 100µm.

S1 cortex analysis	Groups			
	CS (n=6)	CFA (n=6)	CPS (n=6)	CPFA (n=7)
Number of neurons/unit area	21,09 ± 0,43	20,78 ± 0,71	20,45 ± 0,88	22,53 ± 0,59
Number of glial cells/unit area	29,02 ± 0,69	27,47 ± 0,76	24,41 ± 1,21 ^{ab}	28,44 ± 0,31 ^c
Neuronal area (µm ²)	145,06 ± 1,41	148,95 ± 1,88	143,82 ± 1,93	146,69 ± 2,54
Neuronal perimeter (µm)	45,18 ± 0,53	47,69 ± 0,45	45,13 ± 0,88	46,65 ± 0,67
Glia-neuron index	1,31 ± 0,02	1,32 ± 0,01	1,29 ± 0,04	1,30 ± 0,03

Table 2: Analysis S1 cortex of neurons and glial cells of the groups at 29 days of age. CS = Control Saline group (n=14); CFA = Control Folic Acid group (n=17); CPS = Cerebral Palsy Saline group (n=15); CPFA = Cerebral Palsy Folic Acid group (n=17). The data are shown as mean ± standard error. ANOVA two-way followed by Tukey test. ^aP<0,05 versus CS group; ^bP<0,05 versus CFA group; ^cP<0,05 versus CPS group.

In the M1 cortex, there was an increase in the number of neurons and glial cells and also the area of the neurons in CPFA group compared to the CFA group (p <0,05). Neonatal treatment with folic acid in rats with cerebral palsy increased the number of neurons and glial cells compared to animals with cerebral palsy that did not receive folic acid treatment (p <0,05). The animals of the CPFA group increased the neuronal area compared to the CS group (p <0,05). Also, there was no significant difference in an initial number of neurons and glial cells between these groups (CPFA versus CS).

M1 cortex analysis	Groups			
	CS (n=6)	CFA (n=6)	CPS (n=6)	CPFA (n=7)
Number of neurons/unit area	23,11 ± 0,32	21,28 ± 0,46	21,56 ± 0,31	23,36 ± 0,44 ^{bc}
Number of glial cells/unit area	30,31 ± 0,58	27,69 ± 0,89	27,08 ± 1,04	30,87 ± 0,77 ^{bc}
Neuronal area (µm ²)	162,51 ± 7,53	146,28 ± 8,62	183,21 ± 9,54 ^b	205,81 ± 9,08 ^{ab}
Neuronal perimeter (µm)	50,14 ± 1,54	53,33 ± 1,81	51,41 ± 1,71	56,22 ± 1,93
Glia-neuron index	1,29 ± 0,02	1,38 ± 0,03	1,31 ± 0,03	1,31 ± 0,02

Table 3: Analysis M1 cortex of neurons and glial cells of the groups at 29 days of age. CS = Control Saline group (n=14); CFA = Control Folic Acid group (n=17); CPS = Cerebral Palsy Saline group (n=15); CPFA = Cerebral Palsy Folic Acid group (n=17). The data are shown as mean ± standard error. ANOVA two-way followed by Tukey test. ^aP<0,05 versus CS group; ^bP<0,05 versus CFA group; ^cP<0,05 versus CPS group

Discussion

Experimental cerebral palsy promoted reduction of body weight and anthropometric measurements. It also led to the delay in the ontogeny of reflexes of negative geotaxia, auditory startle and free-fall righting, as well as the delayed opening of the ear canal and eyes. On the other hand, supplementation with folic acid showed no effect in these parameters, evaluated up to 21 days of the animals, but led to an increase in the number of neurons and glial cells of the motor and somatosensory cortex at 29 days of age in animals with cerebral palsy.

Previous studies with experimental CP also found a decrease in body weight (Strata et al., 2004; Coq et al., 2008; Marcuzzo et al., 2010; Silva et al., 2016; Lacerda et al., 2017). In cerebral palsy in humans, the reduction of body weight and anthropometric measurements are usually found, possibly due to muscle atrophy and malnutrition identified in these individuals (Grammatikopoulou et al., 2009; Bell and Samson-Fang, 2013; Perenc et al., 2015; Penagini et al., 2015; Scarpato et al., 2017). Neonatal treatment with folic acid did not promote changes in body weight and anthropometric measures similar to those found in humans (Steenweg-De Graaff et al., 2017), whose somatic measurements were not altered in the fetus or the child after supplementation of this vitamin.

Marcuzzo et al (2010) also found a delay in the development of the negative geotaxis reflex in the experimental CP. Individuals with cerebral palsy present movement disorders called upper motor neuron syndrome, either due to the absence of cortical circuit inhibition or loss/absence of appropriate sensorimotor control (Rethlefsen et al., 2010; Richards and Malouin, 2013). As a result, these individuals exhibit hyperreflexia, spasticity and repressed developmental reactions (Rethlefsen et al., 2010; Richards and Malouin, 2013), leading to the exacerbation of atypical reflexes and, consequently, delaying the maturation of common reflexes in development. Studies have shown that treatment with folic acid before birth improves the development of reflexes (Li et al, 2018). However, if folic acid treatment is initiated only after birth, there is no change in reflex ontogenesis as observed in the present study. For the improvement of reflex ontogenesis, folic acid treatment must be started before gestation.

Türedi Yildirim et al. (2015) found that there is a significant increase in homocysteine levels in patients with cerebral palsy. A diet low in folic acid is associated with elevated levels of homocysteine. Homocysteine, a toxic amino acid, induces toxicity in brain tissue, increasing oxidative stress and lipid peroxidation and reducing antioxidant defenses (Matté et

al., 2007; Koohpeyma et al., 2019). Koohpeyma and colleagues (2019) found that treatment with folic acid promoted an increase in the activity of antioxidant enzymes and increased the number of neural cells in the cerebellum of rats with hyperhomocysteinemia. These data reinforce our findings, whose numbers of neurons increased in the motor cortex, indicating the beneficial effect of neonatal folic acid treatment against the neurotoxic effects of cerebral palsy.

Stigger and co-workers (2013) identified that experimental cerebral palsy in rats was able to increase proinflammatory cytokines and free radicals in the cerebral cortex. Folic acid attenuates the release of pro-inflammatory mediators, modulating the inflammatory response through glial cells (Cianciulli et al., 2016). These cells are responsible for monitoring the central nervous system environment, removing products from cell degradation and protecting neurons against invading agents (Cianciulli et al., 2016). In addition, previous studies (Stipursky et al., 2011; Semple et al., 2013; Farhy-Tselnick and Allen, 2018) indicate that events of the development of the nervous system, such as neurogenesis, gliogenesis, neuronal migration, synapse formation, and myelination occur in the embryonic period and/or in the first weeks of postnatal life of the rat, having glial cells an important relationship with the neurons due to the key role in brain development. Weng et al (2017) have identified that folate metabolism plays a role in the regulation of myelination of oligodendrocytes in the period of development of the central nervous system. Our study found that neonatal treatment with folic acid in cerebral palsy is able to increase the number of glial cells in the somatosensory and motor cortex, suggesting the neuroprotective effect of this vitamin in these individuals.

Semple et al. (2013) explains that after weaning, from the 21st to the 60th day, there is a functional and structural reorganization of the brain regions. According to the present study, such a modification in the formation and development of the nervous system through the neonatal treatment with folic acid in the postnatal period seems to occur slowly over time. The data suggest that the action occurs mainly in the remodeling of the nervous system, stimulating the cellular multiplication in the adolescence phase of the animals, as identified through the histological analysis of neurons and glial cells in the somatosensory and motor cortex of the animals at 29 days of life postnatal.

Conclusion

Neonatal treatment with folic acid in experimental cerebral palsy promotes long-term beneficial effects, leading to cortical changes at the cellular level, increasing the number of neurons and glial cells. This suggests a neuroprotective role in these individuals and perhaps a promise of therapy in neurological diseases. Parameters of somatic growth and maturation of the physical features and development of the reflexes did not change, being necessary a treatment with folic acid before and after the birth to observe improvement in both behavioral and cellular parameters.

Acknowledgements

Professor Yves (University of Lyon/France) for help in several stages of the study.

Declarations of interest

The authors have no conflict of interest.

References

Bax M, et al. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Dev Med Child Neurol*. 2005 Aug;47(8):571-6. <https://doi.org/10.1017/S001216220500112X>

Bell KL, Samson-Fang L. Nutritional management of children with cerebral palsy. *Eur J Clin Nutr*. 2013 Dec;67 Suppl 2:S13-6. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2013.225>.

Burdge GC, Lillycrop KA. Folic Acid supplementation in pregnancy: Are there devils in the detail? *Br J Nutr*. 2012 Dec 14;108(11):1924-30. Epub 2012 Oct 9. <https://doi.org/10.1017/S0007114512003765>

Chan G, Miller F. Assessment and treatment of children with cerebral palsy. *Orthop Clin North Am*. 2014 Jul;45(3):313-25. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2014.03.003>

Cianciulli A, et al. Folic Acid is able to Polarize the Inflammatory response in LPS Activated Microglia by regulating multiple Signaling Pathways. *Mediators Inflamm*. 2016;2016:5240127. Epub 2016 Sep 25. <https://doi.org/10.1155/2016/5240127>

Colver A, et al. Cerebral Palsy. Lancet. 2014 Apr 5;383(9924):1240-9.

[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61835-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61835-8)

Coq JO, et al. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. Exp Neurol. 2008

Mar;210(1):95-108. Epub 2007 Oct 24. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.006>

Crider KS, et al. Folate and DNA methylation: a review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. Adv Nutr. 2012 Jan;3(1):21-38.

<https://doi.org/10.3945/an.111.000992>

Dobbing J. Undernutrition and the developing brain. Am J Dis Child. 1970 Jul;120(5):411-5.

<http://dx.doi.org/10.1590/2317-1782/201420130078>

Farhy-Tselnicker I, Allen NJ. Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development. Neural Dev. 2018 May 1;13(1):7. <https://doi.org/10.1186/s13064-018-0104-y>

Gluckman PD, et al. The developmental origins of adult disease. Matern Child Nutr. 2005 Jul;1(3):130-41. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8709.2005.00020.x>

Grammatikopoulou MG, et al. Diet, feeding practices, and anthropometry of children and adolescents with cerebral palsy and their siblings. Nutrition. 2009 Jun;25(6):620-6. Epub 2009 Feb 11. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.11.025>

Hwang SY, et al. Roles of folate in skeletal muscle cell development and functions. Arch Pharma Res. 2019 Apr;42(4):319-25. Epub 2019 Jan 1.

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12272-018-1100-9>

Jones MW, et al. Cerebral Palsy: Introduction and Diagnosis (Part I). J Pediatr Health Care. 2001 May-Jun;21(3):146-52. <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2006.06.007>

Kolb B, et al. Brain Plasticity and Behavior. *Curr Dir Psychol Sci*. 2003 Feb 1;12(1):1–5.
<https://doi.org/10.1146/annurev.psych.49.1.43>

Kolb B, Gibb R. Brain plasticity and behaviour in the developing brain. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2011 Nov;20(4):265–76.

Koman LA, et al. Cerebral Palsy. *Lancet*. 2004 May 15;363(9421):1619-31.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16207-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16207-7)

Koohpeyma H, et al. Postnatal Administration of Homocysteine Induces Cerebellar Damage in Rats: Protective Effect of Folic Acid. *Neurotox Res*. 2019 Apr;35(3):724-38. Epub 2018 Nov 15. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9979-y>

Krigger KW. Cerebral palsy: An overview. *Am Fam Physician*. 2006 Jan 1;73(1):91-100.

Lacerda DC, et al. Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats. *Physiol Behav*. 2017 May 1;173:69–78. Epub 2017 Jan 30. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.043>

Lalonde R, et al. Effects of folic acid and folinic acid in cognitive and motor behaviours in 20-month-old rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1993 Mar;44(3):703-7.
[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(93\)90188-Y](https://doi.org/10.1016/0091-3057(93)90188-Y)

Li W, et al. Periconceptional Folic Acid Supplementation Benefit to Development of Early Sensory-Motor Function through Increase DNA Methylation in Rat Offspring. *Nutrients*. 2018 Mar 1;10(3):292-301. <https://doi.org/10.3390/nu10030292>

Marcuzzo S, et al. M. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. *Brain Dev*. 2010 Apr;32(4):323-31. Epub 2009 May 24. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2009.04.016>

Marques MR, et al. Beneficial effects of early environmental enrichment on motor development and spinal cord plasticity in a rat model of cerebral palsy. *Behav Brain Res.* 2014 Apr 15;263:149–57. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.01.007>

Matté C, et al. Concurrent folate treatment prevents Na⁺,K⁺ -ATPase activity inhibition and memory impairments caused by chronic hyperhomocysteinemia during rat development. *Int J Dev Neurosci.* 2007 Dec;25(8):545-52. Epub 2007 Oct 7. <https://doi.org/10.2174/1570159X113116660047>

Miller AL. The Methylation, Neurotransmitter, and Antioxidant Connections Between Folate and Depression. *Altern Med Rev.* 2008 Sep;13(3):216-26.

Morgane PJ, et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993;17(1):91-128. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-26492011000100006>

Nasser C, et al. Semana da Conscientização sobre a importância do ácido fólico. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* 2015;11(4):199-203. <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-26492005000400009>.

Oskoui M, et al. An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol.* 2013 Jun;55(6):509-19. Epub 2013 Jan 24. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12080>

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain on Stereotaxic Coordinates.* 6th ed. ed. Academic Press; 2006.

Penagini F, et al. Dietary intakes and nutrition issues in neurologically impaired children. *Nutrients.* 2015 Nov 13;7(11):9400-15. <https://doi.org/10.3390/nu7115469>

Perenc L, et al. Cerebral Palsy in children as a risk factor for malnutrition. *Ann Nutr Metab.* 2015;66(4):224-32. Epub 2015 Jun 19. <https://doi.org/10.1159/000431330>

Rethlefsen SA, et al. Classification Systems in Cerebral Palsy. *Orthop Clin North Am*. 2010 Oct;41(4):457-67. <https://doi.org/10.1016/j.ocl.2010.06.005>

Reynolds EH. The neurology of folic acid deficiency. *Handb Clin Neurol*. 2014;120:927-43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-4087-0.00061-9>

Richards CL, Malouin F. Cerebral palsy: definition, assessment and rehabilitation. *Handb Clin Neurol*. 2013;111:183-95. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-52891-9.00018-X>

Rosenbaum P, et al. A report: the definition and classification of cerebral palsy April 2006. *Dev Med Child Neurol Suppl*. 2007 Feb;109:8-14. Erratum in: *Dev Med Child Neurol*. 2007 Jun;49(6):480.

Sachdev P. Homocysteine and neuropsychiatric disorders. *Braz J Psychiatry*. 2004 Mar;26(1):50-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462004000100013>

Scarpato E, et al. Nutritional assessment and intervention in children with cerebral palsy: a practical approach. *Int J Food Sci Nutr*. 2017 Sep;68(6):763-770. Epub 2017 Feb 16. <https://doi.org/10.1080/09637486.2017.1289502>

Semple BD, et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol*. 2013 Jul-Aug;106-107:1-16. Epub 2013 Apr 11. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>

Sengpiel F. The critical period. *Curr Biol*. 2007 Sep 4;17(17):42-3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.017>

Silva HJ, et al. Protocol of mensuration to avaliation of indicators of somatic development of Wistar rats. *Int J Morphol*. 2005;23(3):227-30. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022005000300006>

Silva KO, et al. Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. *Int J Dev Neurosci*. 2016 Aug;52:38–45. Epub 2016 May 19. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.05.002>

Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain. II: Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Res*. 1971 Apr 16;28(1):85–95. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(71\)90526-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(71)90526-9)

Soares JK, et al. Acceleration of reflex maturation and physical development in suckling rats: effects of a maternal diet containing lipids from goat milk. *Nutr Neurosci*. 2014 Jan;17(1):1-6. Epub 2013 Nov 26. <https://doi.org/10.1179/1476830513Y.0000000068>

Stavsky M, et al. Cerebral Palsy – Trends in Epidemiology and recent development in prenatal mechanisms of disease, treatment, and prevention. *Front Pediatr*. 2017 Feb 13;5:21. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00021>

Stearns S, et al. The effects of phenotypic plasticity on genetic correlations. *Trends Ecol Evol*. 1991 Apr;6(4):122–6. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(91\)90090-K](https://doi.org/10.1016/0169-5347(91)90090-K)

Steenweg-de Graaf J, et al. Associations of maternal folic acid supplementation and folate concentrations during pregnancy with foetal and child head growth: the Generation R Study. *Eur J Nutr*. 2017 Feb;56(1):65-75. Epub 2015 Oct 26. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-1058-z>

Stigger F, et al. Inflammatory response and oxidative stress in developing rat brain and its consequences on motor behavior following maternal administration of LPS and perinatal anoxia. *Int J Dev Neurosci*. 2013 Dez;31(8):820-7. Epub 2013 Oct 15. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.10.003>

Stipursky J, et al. Neuron-glia signaling: implications for astrocyte differentiation and synapse formation. *Life Sci*. 2011 Oct 10;89(15-16):524-31. Epub 2011 May 3. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2011.04.005>

Stoknes M, et al. The effects of multiple pre- and perinatal risk factors on the occurrence of cerebral palsy. A Norwegian register based study. *Eur J Paediatr Neurol*. 2012 Jan;16(1):56-63. Epub 2011 Nov 21. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2011.10.004>

Strata F, et al. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization - implications for a rodent model of cerebral palsy. *Neuroscience*. 2004;129(1):141-56. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.024>

Tchantchou F, Shea TB. Folate deprivation, the methionine cycle, and Alzheimer's disease. *Vitam Horm*. 2008;70:83-97. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-44462004000100013>

Tucker DM, et al. Critical periods for the neurodevelopmental processes of externalizing and internalizing. *Dev Psychopathol*. 2015 May;27(2):321-46. <https://doi.org/10.1017/S0954579415000024>

Türed Yildirim A, et al. The role of prothrombotic factors in children with hemiplegic cerebral palsy. *Minerva Pediatr*. 2015 Aug;67(4):279-84. Epub 2014 Jul 18.

Uehara SK, Rosa G. Association between folic acid deficiency and disease and prevention strategies: a critical view. *Rev Nutr*. 2010;23(5):881-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000500018>

Vannucchi H, Monteiro TH. Ácido Fólico. In: ILSI Brasil- International Life Sciences Institute do Brasil. (Org.). *Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes*. São Paulo: ILSI; 2010. v.10, p.3-22.

Weng Q, et al. Folate Metabolism Regulates Oligodendrocyte Survival and Differentiation by Modulating AMPK α Activity. *Sci Rep*. 2017 May 11;7(1):1705. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01732-1>

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO ORIGINAL.

Assunto Thank you for your submission to Experimental Neurology

De Experimental Neurology

Para: <aeltoscano@yahoo.com.br>

Data seg, jun 24 2019 às 17:59

*** Automated email sent by the system ***

Dear Professor Toscano,

Thank you for sending your manuscript Neonatal treatment with folic acid increases the number of neural cells of specific cortex areas in rat model of cerebral palsy for consideration to Experimental Neurology . Please accept this message as confirmation of your submission.

ANEXO B – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones 2126 8840 / 2126 8351
www.ccb.ufpe.br

Recife, 29 de junho de 2018.

Ofício nº 48/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro**
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 0016/2018

Certificamos que a proposta intitulada "Tratamento neonatal com ácido fólico tem ação terapêutica na paralisia cerebral experimental.", Registrada com o nº 0016/2018 sob a responsabilidade de **Prof.ª Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 06/06/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/07/2018 a 30/01/2019
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	56
Peso/Idade	220-250g/ 90-120 dias
Sexo	Macho (48) e fêmea (08)
Origem	Departamento de Nutrição - UFPE

Atenciosamente,

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