



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

CAROLINA RAMOS DE MENDONÇA

**MODELO EXPERIMENTAL DE MICROCEFALIA DESENVOLVIMENTO
MURINOMÉTRICO E NEUROMOTOR EM RATOS SUBMETIDOS OU NÃO
AO POLIFENOL (KAEMPFEROL) NO PERÍODO NEONATAL**

Recife

2020

CAROLINA RAMOS DE MENDONÇA

**MODELO EXPERIMENTAL DE MICROCEFALIA DESENVOLVIMENTO
MURINOMÉTRICO E NEUROMOTOR EM RATOS SUBMETIDOS OU NÃO
AO POLIFENOL (KAEMPFEROL) NO PERÍODO NEONATAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Área de Concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientador: Prof Dr Raul Manhães de Castro

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Lígia Cristina Monteiro Galindo

Recife

2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M539m Mendonça, Carolina Ramos de.
Modelo experimental de microcefalia desenvolvimento murinométrico e neuromotor em ratos submetidos ou não ao polifenol (Kaempferol) no período neonatal / Carolina Ramos de Mendonça. – 2020.
87 f.: il.; tab.; gráf.; 30 cm.

Orientador: Raul Manhães de Castro.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2020.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Microcefalia. 2. Polifenóis. 3. Serotonina. 4. Kaempferol. 5. Desenvolvimento. I. Castro, Raul Manhães de (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-129)

CAROLINA RAMOS DE MENDONÇA

**MODELO EXPERIMENTAL DE MICROCEFALIA DESENVOLVIMENTO
MURINOMÉTRICO E NEUROMOTOR EM RATOS SUBMETIDOS OU NÃO AO
POLIFENOL (KAEMPFEROL) NO PERÍODO NEONATAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição

Aprovada em: 20 / 02 / 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Kelli Nogueira Ferraz Pereira Atholf
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Raquel da Silva Aragão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr. Eduardo Carvalho Lira
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** que me conduziu até aqui mesmo quando nem eu acreditava que poderia.

A minha mãe **Lúcia Carla**, por não ter me deixado desistir (literalmente) e por todo apoio ao longo dessa jornada, minhas irmãs **Camila Ramos** e **Carla Ramos** pelas distrações, mesmo quando devia estar escrevendo algo.

Ao meu orientador, professor **Raul Manhães**, pela generosidade e oportunidade concedida desde a iniciação científica, à minha coorientadora **Lígia Gallindo**, pela oportunidade e palavras de incentivo sempre encorajadoras, nunca esquecerei.

A todos os professores do grupo que contribuíram de forma direta ou indireta para o meu crescimento neste período.

A professora **Tâmara Gomes**, que abriu as portas para o mundo científico, sou muito grata pela oportunidade.

A todos amigos feitos ao longo do mestrado, sempre melhorando o convívio em momentos de estresse. Especialmente **Bárbara Juacy**, que está comigo desde a iniciação científica sempre pronta a ajudar como pode, com certeza uma amiga que levarei para a vida. **Henrique José** por sempre nos divertir e ajudar nos momentos de dúvida e que apesar de “brigar” comigo sempre, sei que tem um bom coração e **Luana Olegário** um presente do mestrado, e a menina mais engraçada e desesperada que já conheci, sempre compartilhando momentos de desespero.

Obrigada aos estagiários **Emanuelly** e **Daniel**, que dividiram comigo as responsabilidades deste projeto, sem vocês este trabalho não seria possível.

A Coordenação da pós-graduação em Nutrição em especial **Cecília Arruda** que em um momento de dúvida não me deixou desistir.

Por fim, a **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de PE (FACEPE)** pelo apoio financeiro.

RESUMO

A Microcefalia é caracterizada por malformação congênita com desenvolvimento inadequado do cérebro. Estudos tem revelado prejuízo no desenvolvimento do sistema serotoninérgico em microcefálicos. Entretanto, algumas substâncias como o polifenol Kaempferol poderiam minimizar este dano, pois possuem capacidade de inibir a atividade da enzima Monoamina Oxidase (MAO). A inibição da MAO poderia gerar maior disponibilidade sináptica de serotonina diminuindo os danos causados na prole submetida a um modelo experimental de microcefalia. O objetivo deste trabalho foi avaliar as repercussões do tratamento neonatal com o polifenol (*Kaempferol*) sobre o peso corporal e encefálico, desenvolvimento murinométrico, ontogênese de reflexos e atividade locomotora na prole submetida a um modelo experimental de microcefalia. Foram utilizadas 18 ninhadas provindas de ratas Wistar. Após a confirmação da gestação, as ratas prenhas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais: Grupo Controle (C, n=10 ninhadas) que recebeu azeite de oliva (0,5 ml/100 g de peso corporal, i.p.) e Grupo Microcefalia (M, n=8 ninhadas) que recebeu Busulfan® (Sigma®, 10 mg/kg, 0,5mL/100g de peso corporal, i.p.). Cada ninhada foi composta por 8 filhotes dos quais 4 receberam solução de veículo dimetilsulfóxido (DMSO) (1ml DMSO a 2,4% em solução salina i.p.) e 4 receberam Kaempferol (14mg/kg, DMSO 2,4% v/v em solução salina i.p.) do 3° ao 7° dia pós natal (DPN). Dessa forma, foram constituídos 4 subgrupos: Controle + Veículo (C+V); Controle + Kaempferol (C+K); Microcefalia + Veículo (M+V); Microcefalia + Kaempferol (M+K). Foram avaliados: Peso corporal, indicadores murinométricos do desenvolvimento, ontogênese de reflexos, atividade locomotora, peso dos músculos e encéfalo. Quanto aos resultados o grupo M+V apresentou redução do eixo ântero-posterior do crânio em comparação com o grupo C+V no 1° e 21° DPN. Quanto ao eixo láltero-lateral do crânio o grupo M+K apresentou uma redução deste eixo em comparação com o grupo C+K no 1°, 6°, 15° e 21° DPN. Em relação ao comprimento da cauda o grupo M+V apresentou diminuição em comparação com o grupo C+V no 9° e 21° DPN, já o grupo M+K apresentou diminuição em comparação com o grupo C+K no 15° e 21° DPN. No que diz respeito aos reflexos, os grupos M+V e M+K obtiveram atraso no desaparecimento no reflexo de preensão palmar em comparação com os grupos C+V e C+K

respectivamente. Semelhantemente os grupos M+V e M+K apresentaram uma maior locomoção em relação aos controles C+V e C+K respectivamente. O tratamento gestacional com Busulfan® foi associado a prejuízo em alguns indicadores murinométricos do desenvolvimento, o que pode ser indicativo de microcefalia, além disso os animais submetidos a este tratamento farmacológico apresentaram dano na locomoção representado pela hiperatividade. O polifenol Kaempferol parece atrasar o aparecimento da hiperatividade nos animais tratados com Busulfan®, porém não foi capaz de reverter os danos na ontogênese de reflexos e indicadores murinométricos nesses animais.

Palavras-chave: Microcefalia. Polifenóis. Serotonina. Kaempferol. Desenvolvimento.

ABSTRACT

Microcephaly is characterized by congenital malformation with inadequate brain development. Studies have revealed an impairment in the development of the serotonergic system among microcephalic. Some substances such as the polyphenol Kaempferol could minimize this damage once this polyphenol have neuroprotective properties action and the ability to inhibit the activity of the enzyme Monoamine Oxidase. The increased availability of serotonin generated by MAO inhibition could reverse or decrease the damage caused to the offspring submitted to an experimental model of microcephaly. The objective was to evaluate the repercussions of neonatal treatment with Kaempferol on body and brain weight, murinometric development, reflex ontogenesis and locomotor activity in the offspring submitted to an experimental model of microcephaly. Eighteen litters from Wistar rats were used. After confirmation of pregnancy, the pregnant rats were randomly assigned to two experimental groups: Control Group (C, n = 10 litters) that received olive oil (0.5 ml / 100 g of body weight, ip) and Microcephaly Group (M, n = 8 litters) that received Busulfan® (Sigma®, 10 mg / kg, 0.5 ml / 100 g of body weight, ip). Each litter was composed of 8 puppies of which 4 received dimethyl sulfoxide vehicle solution (DMSO) (1ml DMSO 2.4% in saline ip) and 4 received Kaempferol (14mg / kg, DMSO 2.4% v / v in solution saline ip) from the 3rd to the 7th postnatal day (PND). Thus, 4 subgroups were created: Control + Vehicle (C + V); Control + Kaempferol (C + K); Microcephaly + Vehicle (M + V); Microcephaly + Kaempferol (M + K). Body weight, murinometric indicators of development, ontogenesis of reflexes, locomotor activity, weight of muscles and brain were evaluated. The M + V group showed a reduction in the antero-posterior axis of the skull compared to the C + V group in the 1st and 21st (PND). with the C + K group on the 1st, 6th, 15th and 21st PND. Regarding the length of the tail, the M + V group showed a decrease in comparison with the C + V group on the 9th and 21^o PND, whereas the M + K group showed a decrease compared to the C + K group on the 15th and 21st PND. Regarding the handgrip reflexes, the M + V and M + K group had a delay in the disappearance of this reflex in comparison with the C + V and C + K groups respectively. Similarly, groups M + V and M + K showed greater locomotion compared to controls C + V and C + K respectively. Gestational treatment with Busulfan® was associated with impairment in some murinometric indicators of development, which

may be indicative of microcephaly. In addition, naimias submitted to this pharmacological treatment showed damage in locomotion represented by hyperactivity. The polyphenol Kaempferol seemed to delay the onset of hyperactivity in animals treated with Busulfan®, but it was not able to reverse the damage in reflex ontogenesis and murinometric indicators among these animals.

Key words: Microcephaly. Polyphenols. Serotonin. Kaempferol. Development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Desenho Experimental.....	31
Figura 2 -	Eixo Látero-lateral do crânio.....	32
Figura 3 -	Eixo Ântero-posterior do crânio.....	32
Figura 4 -	Eixo Longitudinal.....	33
Figura 5 -	Comprimento da Cauda.....	33
Figura 6 -	Preensão Palmar.....	34
Figura 7 -	Recuperação de Decúbito.....	35
Figura 8 -	Colocação Pelas Vibrissas.....	35
Figura 9 -	Resposta ao Susto.....	36
Figura 10 -	Aversão ao Precipício.....	36
Figura 11 -	Geotaxia Negativa.....	37
Figura 12 -	Queda Livre.....	37
Figura 13 -	Bar Holding.....	38
Figura 14 -	Representação esquemática do Campo Aberto e do sistema de monitoramento.....	39
Gráfico 1 -	Peso Corporal na Lactação (1° ao 21° DPN)	40
Gráfico 2 -	Peso Corporal aos 30 dias.....	41
Gráfico 3 -	Estudo dos Indicadores Murinométricos (1° ao 21° DPN)...	43
Gráfico 4 -	Ontogênese de Reflexos (1° ao 21° DPN).....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Peso absoluto dos Tecidos no 45°DPN	44
Tabela 2 -	Peso relativo dos tecidos no 45° DPN.....	44
Tabela 3 -	Atividade Locomotora nos dias 8, 14, 17, 21 e 30 DPN.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização mundial da saúde
MAM	Acetato de Metilazoximetanol
5-HT	Serotonina
MAO	Monoamina Oxidase
DNPM	Desenvolvimentoneuropsicomotor
DPN	Dia pós-natal
NMDA	N-metil-d-aspartato
C	Controle
M	Microcefalia
C+V	Controle + Veículo
C+K	Controle + Kaempferol
M+V	Microcefalia + Veículo
M+K	Microcefalia + Kaempferol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EAPC	Eixo ântero posterior do crânio
ELLC	Eixo látero-lateral do crânio
EL	Eixo longitudinal
CC	Comprimento de cauda
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
MM	Milímetro

CEUA Comissão de Ética em Uso de Animais

CONSEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

LENIBE Laboratório de Estudos em Nutrição e Experimentação Biomédica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	PERÍODO CRÍTICO E PLASTICIDADE DO SISTEMA NERVOSO.....	17
2.2	MICROCEFALIA.....	19
2.3	MICROCEFALIA E SEROTONINA (5-HT)	21
2.4	POLIFENÓIS E SEROTONINA.....	24
3	HIPÓTESE.....	27
4	OBJETIVOS.....	28
4.1	OBJETIVO GERAL.....	28
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5	MÉTODOS.....	29
5.1	LOCAL DO ESTUDO.....	29
5.2	ANIMAIS.....	29
5.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	29
5.4	DESENHO EXPERIMENTAL.....	31
5.4.1	Análise Experimental.....	31
5.4.2	Peso Corporal e Encefálico.....	31
5.4.3	Estudo dos Indicadores Murinométricos do Desenvolvimento.....	31
5.4.4	Ontogênese de Reflexos.....	34

5.4.5	Atividade Locomotora.....	38
5.4.6	Estatística.....	39
6	RESULTADOS.....	40
6.1	PESO CORPORAL.....	40
6.2	INDICADORES MURINOMÉTRICOS DO DESENVOLVIMENTO	42
6.3	PESO DOS TECIDOS.....	44
6.4	ONTOGÊNESE DE REFLEXOS.....	45
6.5	ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	47
7	DISCUSSÃO.....	48
8	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
	APÊNDICE A – ACTION OF FLAVONOLS ON THE SEROTONIN SYSTEM IN RODENT MODELS: A PRECLINICAL SYSTEMATIC REVIEW.....	61
	APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO.....	79
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EM ESTUDO DE ANIMAIS – CEUA.....	87

1 INTRODUÇÃO

A Microcefalia é definida como malformação congênita com desenvolvimento inadequado do cérebro (DOLK, 1991). Este sinal clínico é representado por menor perímetro cefálico em relação ao de outras crianças do mesmo sexo e idade, podendo apresentar como sequelas o surgimento de incapacidade intelectual, convulsões e incapacidades físicas com alteração do tônus muscular (ALVES et al., 2018).

Segundo a OMS a microcefalia é considerada um evento raro em todo o mundo (WHO, 2018). No Brasil ela também é considerada uma condição rara onde foi estimada em 1,98 casos por 10.000 nascidos vivos entre 1982 e 2013 (ECLAM, 2015). Contudo, em 2015 houve um aumento significativo no número de casos de microcefalia no Brasil, em que foi observado uma prevalência de 5,46 casos por 10.000 nascidos vivos (CABRAL et al., 2017). Desde os primeiros casos de microcefalia estudos têm sido realizados visando avaliar a possível associação entre os casos de microcefalia e os surtos de infecção pelo vírus ZIKA no Brasil (Ministério da Saúde, 2018). Em 2016, estudo realizado no Brasil confirmou a associação entre a infecção pelo vírus ZIKA durante a gestação e a microcefalia (MIRANDA-FILHO et al., 2016).

Modelos de microcefalia experimental têm sido utilizados frequentemente, pois mimetizam o processo que ocorre em casos da referida malformação (FURUKAWA et al., 2007; FUNAHASHI; INOUE; YAMAMURA, 1992; AZMITIA, 1994). O Busulfan[®], por exemplo, é um agente de alquilação usado como anti-neoplásico no tratamento de leucemia mielóide crônica (BUGGIA et al., 1994; FURUKAWA et al., 2007). Este medicamento possui um potencial teratogênico (ROCK et al., 1986), e estudos experimentais tem demonstrado a capacidade do Busulfan[®] em induzir a microcefalia em ratos (FURUKAWA, 2007; GOUVEIA, 2020) (NAGAI, H. 1972; KASUGA, F.1986).

Em humanos uma pesquisa revelou relação entre utilização de inibidores da recaptação de serotonina durante a gestação e aumento do risco para o desenvolvimento de microcefalia, o que pode significar que indivíduos acometidos pela microcefalia apresentam prejuízo no desenvolvimento do sistema serotoninérgico (NISHIGORI et al., 2017) . Modelos experimentais de microcefalia em animais também confirmam esta relação (AZMITIA, 1994). O estudo de FUNASHI, *et al* (1992) que induziu microcefalia em ratos, demonstrou redução dos níveis de serotonina no núcleo

dorsal e medial da rafe associadas à desorganização das camadas do córtex cerebral. Uma das sequelas deste sinal clínico é o aumento do tônus muscular, que em ratos pode ser relacionado aos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} ligados a neurônios motores amplamente distribuídos na medula espinhal (DOLY *et al.*, 2004).

Algumas substâncias podem auxiliar na diminuição dos prejuízos decorrentes da microcefalia. Os polifenóis, por exemplo, são substâncias encontradas de forma abundante nos vegetais (BARET *et al.*, 2013) que possuem função neuroprotetora principalmente devido a sua ação antiinflamatória e antioxidante (STEVANOVIC; DIOUF; GARCIA-PEREZ, 2009; GOMEZ-PINILLA; NGUYEN, 2012). Isto porque lesões neurológicas podem advir da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio danificando células, DNA, proteínas e lipídios, contudo o consumo de substâncias antioxidantes auxiliam na homeostase metabólica protegendo componentes neuronais dos danos oxidativos (GOMEZ-PINILLA; NGUYEN, 2012). Os polifenóis ainda possuem capacidade de inibição da enzima monoamina oxidase (MAO), que é responsável pela degradação de monoaminas como a serotonina na fenda sináptica, portanto sua inibição tem como consequência a elevação dos níveis de 5-HT no cérebro (GOMEZ-PINILLA; NGUYEN, 2012). Um dos polifenóis responsáveis por esta ação é o Kaempferol, um flavonol vastamente encontrado no Brasil, e que vem frequentemente sendo estudado como antidepressivo devido à sua interferência na MAO (SLOLEY *et al.*, 2000); PARK *et al.*, 2010).

Contudo, há escassez na literatura de estudos que utilizem Kaempferol no tratamento de alterações morfofuncionais características da microcefalia no que se refere a elementos chaves na avaliação da integridade do sistema neuro-músculo-esquelético. Sendo assim, o objetivo do estudo será avaliar as repercussões do tratamento neonatal com um polifenol (*Kaempferol*) sobre o peso corporal, peso dos músculos e encéfalo, desenvolvimento murinométrico, maturação dos reflexos e atividade locomotora em ratos expostos a um modelo experimental de microcefalia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PERÍODO CRÍTICO DE SEENVOLVIMENTO E PLASTICIDADE DO SISTEMA NERVOSO

Existem períodos do desenvolvimento do sistema nervoso que são considerados de maior vulnerabilidade do organismo devido a um aumento da atividade de eventos como neurogênese, migração celular, diferenciação, sinaptogênese (RICE; JR, 2000). Em humanos, este período inicia-se no último trimestre de gestação e perdura até os três ou quatro primeiros anos de vida (McCance e Widdowson, 1974), no rato, compreende a gestação e as três primeiras semanas de vida pós-natal (MILLER et al., 1978). Logo, condições ambientais desfavoráveis que venham a ocorrer durante o período da gestação por exemplo, podem ser responsáveis em parte pelo risco de aparecimento de doenças em outras fases da vida (RICE; JR, 2000).

Entre os insultos que atingem o período da gestação e podem acarretar no surgimento de doenças mais tardiamente está a desnutrição (RICE; JR, 2000). Estudo desenvolvido por RAVELLI, (1976) relacionou desnutrição na gestação ao desenvolvimento de obesidade. Nos anos de 1944-1945 ocorreu um desastre que ficou conhecido como a fome holandesa (Dutch famine), quando durante a II guerra mundial houve um longo período de fome que acarretou em grande número de gestantes desnutridas, o estudo de Ravelli revelou que dependendo do período de exposição a desnutrição os filhos destas gestantes eram mais propensos a desenvolver obesidade (RAVELLI, et al., 1976).

Já em ratas a desnutrição proteica durante a gestação e lactação demonstrou redução de peso da prole aos 21 dias, características físicas e reflexos atrasados na prole (Smart and Dobbing, 1971). Outro estudo que induziu desnutrição através de dois diferentes métodos, o primeiro pela manipulação do tamanho da ninhada e o segundo por desnutrição materna, observou um retardo do crescimento cerebral na prole e atribuiu isso a uma interferência na proliferação celular e redução da população de células no cérebro, reforçando a ideia de período crítico para o desenvolvimento do sistema nervoso (ALTMAN; DAS; ANDERSON, 1971). Porém o organismo possui habilidade para reagir às agressões ambientais, através de modificações

neuroquímicas e morfofisiológicas, sendo este fenômeno chamado de plasticidade fenotípica (HALES and BARKER, 1992; HALES; BARKER, 2001).

A plasticidade fenotípica representa as respostas de organismos a diferentes condições ambientais que geram uma série de fenótipos distintos (estados morfológicos ou fisiológicos) potencialmente expressos por um genótipo (WEST-EBERHARD, 2005; GLUCKMAN; HANSON, 2017). A plasticidade está, pois, susceptível à influência dos genes (genoma individual) e do ambiente (variação do fenótipo). O sistema nervoso por exemplo, pode ser afetado pela interação organismo-ambiente, e modificações na estrutura e função deste sistema podem ser resultado desta interação, este evento é denominado de plasticidade neural e pode ocorrer em todo o estágio de desenvolvimento (PHELPS, 1990).

Estudos sobre a plasticidade do sistema nervoso podem ser divididos entre aqueles que focam na manipulação do ambiente e avaliam mudanças morfológicas neurais, sendo denominados de estudos sobre a plasticidade neural, e aqueles que focam em mudanças comportamentais decorrentes de lesões no sistema nervoso, denominados de estudos sobre a recuperação de função (KOLB & WHISHAW, 1989).

Segundo KOLB & WHISHAW, (1989) mecanismos de plasticidade cerebral se enquadram em três categorias gerais: anatômicas, neuroquímicas e metabólicas. A plasticidade anatômica diz respeito a habilidade das sinapses para modificar sua própria atividade, através da germinação de axônios, regeneração ou expansão de uma superfície dendrítica, destacando mudanças estruturais; A plasticidade neuroquímica relaciona-se com a capacidade que a sinapse tem de modificar sua atividade através do aumento da síntese e liberação de neurotransmissores ou elevação da resposta pós-sináptica destes neurotransmissores; A plasticidade metabólica corresponde a alterações metabólicas que ocorrem principalmente em áreas corticais, que podem ser tanto no mesmo hemisfério como contralateral as lesões corticais. Portanto desordens neurológicas podem ser resultado de agressões ambientais durante o desenvolvimento do sistema nervoso (WHO, 2018; AZMITIA, 1994; UEDA; NISHIMURA, 1999; FURUKAWA et al., 2007).

A microcefalia, por exemplo, pode ser causada por infecções, exposição a químicos tóxicos, anormalidades genéticas e desnutrição, bem como por lesões pré e

perinatais no encéfalo em desenvolvimento gerando repercussões duradouras precoces e/ou tardias sobre o desenvolvimento do indivíduo (WHO, 2018; FURUKAWA, 2007; Ueda, 1999; Azmitia *et al.*, 1994).

2.2 MICROCEFALIA

A Microcefalia é um sinal clínico caracterizado por malformação congênita com desenvolvimento inadequado do cérebro (DOLK, 1991; Ministério da Saúde, 2016), porém, ela também pode ocorrer após o nascimento e pode se manifestar devido a interrupções no crescimento cerebral. É provável que a microcefalia congênita seja resultado da diminuição na produção de neurônios enquanto que a microcefalia pós-natal seria provocada pela redução da conexão/atividade dendrítica de um número normal de neurônios (WOODS, 2004).

Segundo a OMS, a microcefalia é considerada um evento raro em todo o mundo (WHO, 2018). No Brasil, onde também é considerada uma condição rara, foi estimada a presença de 1,98 casos por 10.000 nascidos vivos entre 1982 e 2013 (ECLAM, 2015). Contudo, em 2015 houve um aumento significativo no número de casos de microcefalia no Brasil e a prevalência passou a ser de 5,46 casos por 10.000 nascidos vivos (CABRAL *et al.*, 2017)

Clinicamente, a microcefalia é representada por menor perímetro cefálico em relação ao de outras crianças do mesmo sexo e idade (Dolk, 1991; Ministério da Saúde, 2017). Crianças portadoras de tal sinal clínico podem desenvolver incapacidade intelectual, convulsões e incapacidades físicas com aumento do tônus muscular (FLOR *et al.*, 2017; Ministério da Saúde, 2017). Crianças com microcefalia frequentemente apresentam um atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) com controle cervical prejudicado, espasticidade de tronco ou membros, encurtamento muscular, alterações de reflexos, ineficiente manutenção da postura sentada e dificuldade de apoio para engatinhar (BARATA, *et al.* 2018). Estudo observacional sobre DNPM em portadores de microcefalia pelo vírus ZIKA, identificou atraso no DNPM e aumento do tônus muscular dessas crianças (FLOR *et al.*, 2017). Isto pode acontecer devido a fatores neurogênicos ainda não conhecidos que afetam

trato corticoespinal e neurônios motores, levando à diminuição dos movimentos (MOORE et al., 2017).

O diagnóstico de Microcefalia pode ser realizado precocemente através da ultrassonografia fetal, sendo a melhor possibilidade de diagnóstico a realização deste exame no final do segundo trimestre ou no terceiro trimestre da gestação (WHO, 2018). Após o nascimento, a circunferência da cabeça do recém-nascido deve ser mensurada nas primeiras 24h e comparada com padrões de crescimento estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2018).

Modelos experimentais de microcefalia já são bem estabelecidos no meio científico (UEDA, 1999; FUNASHI, 1992; FURUKAWA, 2007). Porém um novo modelo experimental utilizando o vírus ZIKA como indutor de microcefalia tem surgido (MINER et al., 2016). Estudo conduzido por Miner *et al*, 2016, que utilizou dois modelos experimentais com camundongos. Um modelo mais severo que não continha a sinalização de interferon tipo 1 (Ifnar1) (proteína que interfere na replicação de vírus, bactérias) e outro menos severo que recebeu um anticorpo que bloqueia a ação do Ifnar, onde inoculou-se o vírus ZIKA por via subcutânea nos dias embrionários 6 ou 7 (MINER et al., 2016). O primeiro modelo resultou em morte fetal enquanto o segundo demonstrou restrição de crescimento intrauterino e infecção viral na cabeça dos fetos durante um período chave para o neurodesenvolvimento, demonstrando relação entre síndrome fetal e infecção pelo vírus ZIKA (MINER et al., 2016).

Algumas drogas como a cocaína também podem levar a microcefalia (AZMITIA, 1994). Um estudo experimental demonstrou que as ninhadas de ratas que receberam cocaína no 13º dia embrionário apresentavam retardo do crescimento somático e do cérebro, além da significativa redução do peso do cérebro e do corpo quando comparadas ao grupo controle (AZMITIA, 1994). Neste estudo, os autores atribuem o desenvolvimento da microcefalia a diminuição do crescimento de fibras neuronais e diferenciação no córtex (AZMITIA, 1994).

Fármacos também possuem a capacidade de induzir a microcefalia em ratos, um deles é o Busulfan® (Furukawa, 2007), que é um agente alquilante, portanto tem a habilidade de alquilar proteínas e ácidos nucleicos não permitindo a leitura correta do código de DNA (BUGGIA et al., 1994).

A administração de Busulfan® na dose de 10mg/kg, intraperitonealmente, nos 12º, 13º e 14º dias de gestação em ratas, demonstrou que os fetos das gestantes que receberam o medicamento apresentaram microcefalia e microftalmia (redução do volume do olho) (FURUKAWA, 2007). A possível explicação seria o aumento de número de células apoptóticas na camada medial e dorsal do neuroepitélio bem como a redução de sua atividade mitótica (FURUKAWA, 2007). Postula-se que o Busulfan® atuaria prejudicando o ciclo celular (período que antecede a entrada da célula para a mitose), aprisionando as células entre as fases G1 e G2 do ciclo, o que levaria ao aumento da apoptose e inibição mitótica no neuroepitélio (FURUKAWA, 2007). Estudo recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa que utilizou Busulfan® seguindo modelo de Furukawa, (2007), observou que a prole das gestantes que receberam a medicação apresentaram microcefalia, atraso dos reflexos e características físicas e diminuição nos parâmetros morfométricos do córtex somatossensorial e motor ao 28 DPN (GOUVEIA et al., 2020). Sendo assim, o Busulfan® durante a fase gestacional pode ser associado ao modelo experimental de microcefalia.

2.3 MICROCEFALIA E SEROTONINA (5-HT)

O início da expressão fenotípica do sistema serotoninérgico se dá entre o 11º ou 12º dia e o 15º dia de vida embrionária (LAUDER, 1990). Logo após seu surgimento, os neurônios serotoninérgicos projetam-se através do encéfalo para modular primariamente a maturação de outros circuitos neuronais e fazer contatos sinápticos funcionais precoces (OGAWA; MIYATA, 1995). A combinação entre o aparecimento precoce dos neurônios serotoninérgicos e sua larga distribuição nos terminais receptores aponta para o papel chave da serotonina (5-HT) no desenvolvimento encefálico, na auto-regulação destes terminais receptores (WHITAKER-AZMITIA, 2001) e na diferenciação neuronal bioquímica e morfológica (LAUDER, 1990).

Dada sua importância no encéfalo imaturo, a 5-HT pode ser considerada como um fator essencial para o crescimento e regulação do cérebro fetal (WHITAKER-AZMITIA, 2010). Inicialmente, a 5-HT atua de forma autoregulatória agindo na

formação de seus próprios neurônios e, posteriormente, participa de eventos como neurogênese/neuroproteção, gliogênese, migração, diferenciação e maturação neuronais (WHITAKER-AZMITIA, 2010). Devido a sua participação em processos essenciais para o desenvolvimento encefálico, qualquer distúrbio na disponibilidade sináptica de serotonina pode ter consequências na maturação deste órgão (WHITAKER-AZMITIA, 2010; VELASQUEZ; GOEDEN; BONNIN, 2013).

A indução de microcefalia em ratos também demonstrou alterações morfológicas e funcionais de fibras serotoninérgicas no córtex somatossensorial bem como hiper inervação de fibras serotoninérgicas corticais, houve ainda aumento no padrão de distribuição das fibras serotoninérgicas e atraso na liberação de 5-HT no córtex somatossensorial, o que indica a presença de alterações morfológicas e funcionais no sistema serotoninérgico (UEDA; NISHIMURA, 1999). Outro estudo que induziu microcefalia em ratos verificou que esses animais apresentavam diminuição nos números de neurônios serotoninérgicos e déficit na sua morfologia dendrítica neuronal nos núcleos dorsal e medial da rafe (FUNAHASHI; INOUE; YAMAMURA, 1992). Tais alterações foram associadas à desorganização das camadas do córtex cerebral e à distribuição anormal de projeções e terminais de 5-HT no córtex visual (FUNAHASHI; INOUE; YAMAMURA, 1992). Em contrapartida, estudos experimentais que induziram microcefalia em ratos observaram que a administração do agonista do receptor de serotonina 5-HT_{1A} foi capaz de reverter este quadro através da liberação do fator trófico S-100β diminuindo o atraso no crescimento encefálico (AZMITIA *et al.*, 1994).

Dessa forma, o córtex cerebral é uma das regiões que sofrem influencia da serotonina, pois recebe projeções axonais de neuronios serotoninérgicos localizados nos núcleos da rafe (VITALIS; PARNAVELAS, 2003). A participação da 5-HT em eventos importantes para o desenvolvimento do córtex como proliferação, migração e apoptose demonstra a importante contribuição do sistema serotoninérgico na formação de circuitos corticais (VITALIS, PARNAVELAS, 2003). Entretanto, a serotonina não está apenas relacionada a ontogênese e maturação encefálicas, este neurotransmissor também influencia o sistema muscular que parece estar prejudicado em microcefálicos (KAWASHIMA, 2017).

A participação da 5-HT no controle motor tem sido estudada desde 1962 onde há relatos da diminuição da 5-HT no cérebro de indivíduos com doença de Parkinson (BARBEAU, 1962). O sistema serotoninérgico pode modular ações motoras através da interação simultânea com regiões responsáveis pelo controle motor como núcleos da base, cerebelo e medula espinhal (KAWASHIMA, 2017). Nos núcleos da base, a 5-HT é capaz de inibir ou bloquear projeções glutamatérgicas localizadas na substancia nigra. Estas projeções são responsáveis por regular os neurônios gaba, que disparam picos de alta frequência que serão convertidos em comandos motores (DING, 2013). A 5-HT também participa de forma importante na medula espinhal, Ganzer *et al*, (2018) demonstraram que animais com lesão medular têm sua atividade locomotora prejudicada. A medula espinhal recebe projeções de fibras serotoninérgicas e, quando as mesmas são afetadas durante lesão deste seguimento, há alteração na regulação dos receptores de 5-HT (5-HTRs) (GANZER *et al.*, 2018).

Adicionalmente, a serotonina ainda pode atuar sobre redes do gerador de padrão central, que são responsáveis por gerar atividades motoras rítmicas básicas para a locomoção. Receptores de 5-HT podem funcionar de forma antagônica sobre redes locomotoras em camundongos neonatos, enquanto os receptores 5-HT_{2A/7} tem função excitatória, os receptores 5-HT_{1-A/B} possuem função inibitória sobre estas redes, já em roedores maduros a serotonina passa a ter predominantemente um papel excitatório (HACHOUMI, 2019). Além disso a serotonina pode modificar ações motoras por meio da interação com a dopamina (SASAKI-ADAMS; KELLEY; PH, 2001). Estudo experimental mostrou que injeções de 5-HT intra-accumbens foi capaz de aumentar a atividade motora em ratos e esta atividade foi atenuada pela administração de antagonistas da dopamina (SASAKI-ADAMS; KELLEY; PH, 2001).

Dessa forma, dada a relevância do sistema serotoninérgico para processos relacionados ao desenvolvimento encefálico e à coordenação da função muscular, bem como dada a presença de alterações deste sistema em organismos que apresentam microcefalia, o tratamento com compostos neuroprotetores e moduladores do sistema serotoninérgico, como polifenóis, pode representar uma alternativa de tratamento para este sinal clínico.

2.4 POLIFENÓIS E SEROTONINA

Polifenóis são compostos orgânicos encontrados principalmente em plantas (CORY et al., 2018; MANACH et al., 2004). Estes compostos são metabólitos secundários das plantas e exercem uma gama de ações sobre o organismo humano tendo reconhecida função como compostos antioxidantes e antiinflamatórios (CORY et al, 2018; MANACH et al, 2004). O efeito dos polifenóis para a saúde humana tem sido amplamente estudado, apresentando ação preventiva ou terapêutica em doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos, câncer e obesidade (MANACH et al, 2004; CORY et al, 2018; LAGOA et al, 2009) .

A depender de sua estrutura química, os polifenóis podem ser classificados, nos seguintes grupos: estilbenos, ácidos fenólicos, lignanas e flavonoides (MANACH et al, 2004). Os flavonóides ainda podem ser subdivididos nas subclasses flavonóis, flavonas, flavononas, isoflavonas, antocianidinas e flavonóis (catequinas e proantocianidinas) (MANACH et al, 2004). Os flavonóis são os flavonoides encontrados em maior quantidade nos alimentos, sendo o kaempferol e a quercetina os principais representantes desta subclasse. Estes compostos estão presentes na cebola, couve, alho poro e brócolis (MANACH et al, 2004).

Estudos experimentais têm demonstrado que o uso de polifenóis pode alterar os níveis de serotonina através da sua função antioxidante e pela inibição da monoamina oxidase (MAO), (MITRA, 2000; BANDARUK et al., 2012). No que concerne a função antioxidante, enzimas imprescindíveis para a síntese de monoaminas cerebrais como triptofano hidroxilase (TPH) e tirosina hidroxilase (TH) parecem ser suscetíveis a danos oxidativos (MITRA, 2000). Em contrapartida, polifenóis protegem o sistema serotoninérgico contra oxidação (SARUBBO et al., 2017). Tratamento crônico com resveratrol em ratos idosos promoveu aumento na síntese de serotonina, dopamina e noradrenalina, o conteúdo de 5-HT foi aumentado no hipocampo e corpo estriado, enquanto a dopamina aumentou apenas no estriado e a noradrenalina exclusivamente no hipocampo, devido ao efeito protetivo do resveratrol sobre as enzimas TPH e TH contra a oxidação natural do envelhecimento (SARUBBO et al., 2017). Adicionalmente a elevação nos níveis de serotonina também

pode ser explicada pela capacidade dos polifenóis em diminuir a atividade da MAO (BANDARUK *et al.*, 2012). A MAO é uma enzima mitocondrial responsável pela degradação de monoaminas na fenda sináptica, devido ao seu papel de catalisar a desaminação oxidativa de aminas biogênicas e xenobióticas (NABAVI *et al.*, 2015; BANDARUK *et al.*, 2012). Existem dois tipos de MAO: MAO-A que oxida principalmente serotonina, epinefrina e norepinefrina e MAO-B que oxida dopamina (BANDARUK *et al.*, 2012). Os flavonoides estão entre os principais polifenóis inibidores da MAO (BANDARUK *et al.*, 2012).

A quercetina é um dos flavonóis que possuem ação inibitória sobre a atividade da MAO (BANDARUK *et al.*, 2012). Estudo com o objetivo de avaliar a importância da quercetina e outros flavonoides na modulação da atividade da MAO-A, através da medição da formação do produto de desaminação oxidativa de 5-HT no cérebro de camundongos, verificou que a luteolina e quercetina foram eficazes inibidores da MAO-A (BANDARUK *et al.*, 2012). A quercetina não demonstrou atividade inibitória da MAO-A no intestino delgado, indicando que ela pode não possuir efeito colateral ao contrário de algumas drogas antidepressivas inibidores da MAO (BANDARUK *et al.*, 2012). Adicionalmente, um estudo *in vitro* que utilizou os flavonoides antocianinas em enzimas MAO A e B humanas expressas em células de insetos infectadas com baculovirus observou inibição destas duas enzimas o que pode ser associado à prevenção de patologias neuronais (DREISETEL *et al.*, 2009).

O kaempferol, flavonóide presente em extratos de folhas de Ginkgo Biloba também funciona como um inibidor da monoamina oxidase, principalmente a MAO-A que tem preferência por substrato de serotonina (SLOLEY *et al.*, 2000). O *Kaempferol* também foi capaz de prevenir a neurotoxicidade induzida por N-metil-d-aspartato (NMDA) *in vitro* em culturas corticais de rato (SLOLEY *et al.*, 2000). Outro trabalho que utilizou *kaempferol* para avaliar o seu potencial efeito inibitório da monoamina oxidase A e B humanas demonstrou que *kaempferol* foi um potente inibidor da MAO-A, mas não MAO-B (GIDARO *et al.*, 2016). O kaempferol também apresentou ação neuroprotetora em estudo conduzido por LAGOA, *et al.* (2009) onde as doses de 14mg e 21mg deste flavonol reverteram total ou parcialmente a neurodegeneração induzida pelo ácido 3-Nitropropiónico no corpo estriado em ratos adultos, (LAGOA *et al.*, 2009)

Evidências recentes sugerem que as variações na sinalização da 5-HT podem amplificar respostas 'positivas' em um organismo em desenvolvimento (BRUMMELTE et al., 2016; BARROS et al., 2018). Neste caso, fatores que modificam a disponibilidade de 5-HT, como é o caso dos polifenóis, podem atuar como indutores de 'plasticidade' ao invés de serem 'fatores de risco' (ZHEN et al., 2012; ZHAO et al., 2015). Desta forma, a ação inibitória do kaempferol sobre a monoamina oxidase A gerando um aumento da disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica poderia ser sugerida como uma estratégia terapêutica para atenuar os efeitos tratamento farmacológico gestacional com Busulfan® em modelo experimental de microcefalia.

3 HIPÓTESE

O tratamento neonatal com kaempferol reduz os danos em prole de ratos submetida a um modelo experimental de microcefalia, decorrente da administração de Busulfan® durante a gestação.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar as repercussões do tratamento neonatal com o polifenol (*Kaempferol*) sobre o peso corporal e encefálico, desenvolvimento murinométrico, ontogênese de reflexos e atividade locomotora em prole de ratos submetida ao tratamento farmacológico com Busulfan® durante a gestação.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Avaliar em ratos submetidos ao tratamento farmacológico com Busulfan® durante a gestação e posterior tratamento neonatal com Kaempferol:

- 1) Peso corporal
- 2) Indicadores murinométricos do desenvolvimento;
- 3) Ontogênese de Reflexos;
- 4) Atividade locomotora;
- 5) Peso dos músculos e encéfalo;

5 MÉTODOS

5.1 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi executado no Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB) e na Unidade de Estudos em Nutrição e plasticidade Fenotípica, localizados no Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, em Recife.

5.2 ANIMAIS

Foram utilizados 18 ninhadas de ratos da linhagem Wistar (espécie *Rattus Novergicus Albinus*), originários de 18 ratas Wistar adultas e 9 ratos Wistar adultos que foram postos para acasalamento na proporção de 2 fêmeas para 1 macho, provenientes do biotério do Departamento de Nutrição da UFPE, mantidos a temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo claro-escuro de 12/12 horas e livre acesso à água e alimentação.

As progenitoras obedeciam a alguns critérios de inclusão como: Ratas entre 90 e 120 dias de vida, sem parentela e peso entre 220g e 250g. Para machos o critério de inclusão foi: idade acima de 90 dias. Os critérios foram estabelecidos para que os filhotes não sofressem influencia genética e/ou fisiológica.

O protocolo de manipulação e bem-estar dos animais seguiu as orientações da Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais em atividades de ensino ou de pesquisa científica (DBCA), lançada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, processo nº0006/2018.

5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As ratas foram postas para acasalamento e a gestação foi confirmada através da técnica de esfregaço vaginal sendo considerado o 1º dia da gestação, aquele quando foram encontrados espermatozoides no esfregaço e no qual foram formados dois grupos de gestantes: O grupo Controle (C, n=10) que recebeu o veículo azeite

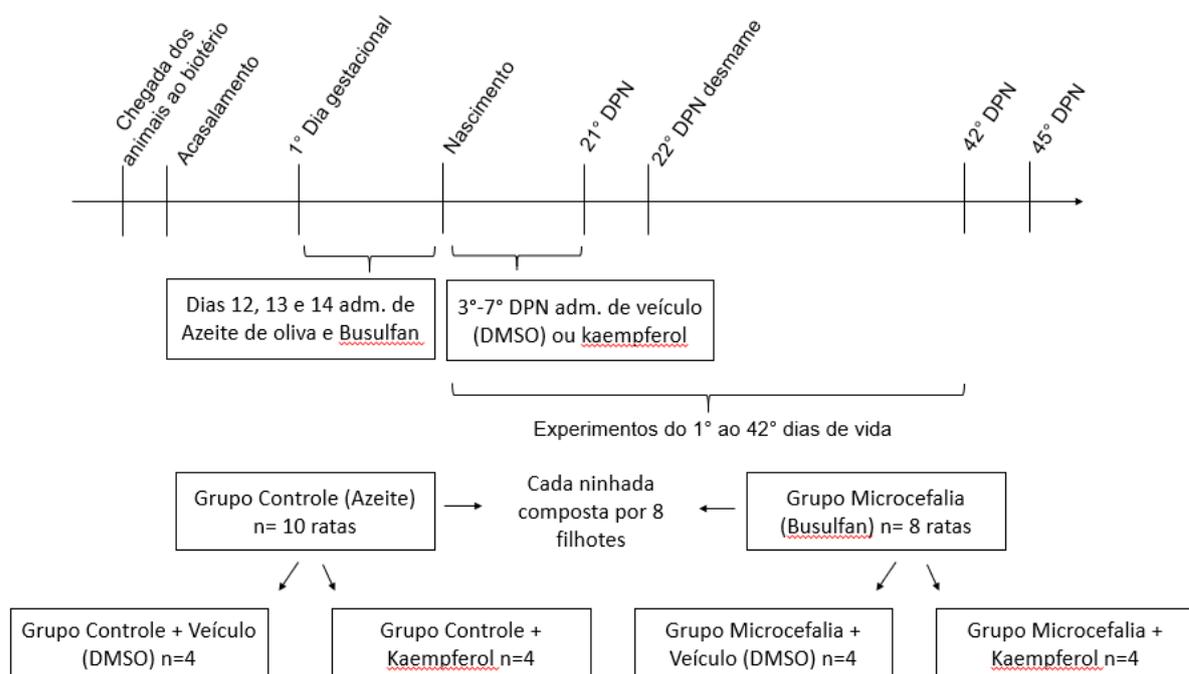
de oliva, administrado via intraperitoneal (0,5 ml/100 g de peso corporal, i.p.) e o grupo Microcefalia (M, n=8) que recebeu Busulfan (Sigma[®], 10 mg/kg, 0,5mL/100g de peso corporal, i.p.), suspenso em azeite de oliva. As ratas foram tratadas diariamente do 12^o ao 14^o dias gestacionais, fase inicial de desenvolvimento do córtex cerebral e sistema serotoninérgico (DESESSO, 2005). Esta dose foi previamente relatada como sendo efetiva para induzir microcefalia em estudo dose/resposta (Furukawa et al. 2007). No 1^o dia pós-natal (DPN), as ninhadas foram compostas pela nutriz e 8 filhotes preferencialmente machos. A ninhada foi completada com fêmeas caso o número de filhotes machos não fosse suficiente. Em cada ninhada, 4 filhotes receberam solução de veículo DMSO (1ml DMSO a 2,4% em solução salina i.p.) ou Kaempferol (14mg/kg, DMSO 2,4% v/v em solução salina i.p.). Esta dose foi utilizada em estudo prévio, e foi capaz de proteger contra neurodegeneração estriatal em ratos jovens (Lagoa *et al*, 2009), formando os subgrupos:

- Controle + Veículo (C+V);
- Controle + Kaempferol (C+K);
- Microcefalia + Veículo (M+V);
- Microcefalia + Kaempferol (M+K).

Os tratamentos foram realizados do 3^o ao 7^o DPN. No 22^o DPN, os filhotes foram desmamados e mantidos em gaiolas contendo 3-4 animais por gaiola até os 45 dias de vida, de acordo com o desenho experimental abaixo (Figura1)

DESENHO EXPERIMENTAL:

Figura 1- Desenho Experimental



Fonte: o autor, 2020

5.4 ANÁLISES EXPERIMENTAIS:

5.4.1 Peso Corporal e Peso Encefálico:

Os filhotes tiveram o peso corporal aferido diariamente durante a lactação (1º ao 21º DPN) bem como aos 30 dias de vida em balança de precisão marre modelo BL3200H. O peso do encéfalo foi aferido no 45º DPN logo após a decaptação.

5.4.2 Estudo dos Indicadores Murinométricos do Desenvolvimento:

Os filhotes machos foram avaliados no 1º, 3º, 6º, 9º, 12º, 15º, 18º e 21º DPN às 9h, com auxílio de um paquímetro digital (Jomaraca®) quanto às seguintes medidas: eixo ântero-posterior do crânio (EAPC), eixo látero-lateral do crânio (ELLC), comprimento da cauda (CC) e eixo longitudinal (EL) (SILVA *et al.*, 2005).

Eixo Látero-Lateral do Crânio

Este eixo foi classificado como a linha imaginária perpendicular ao eixo do crânio, passando pelo centro dos pavilhões auriculares. O pesquisador segurou o animal com uma das mãos, prendendo a cabeça deste entre o indicador e o polegar. A medida do eixo foi realizada em milímetros (mm), (Fig. 2).

Figura 2 - Eixo Látero-lateral



Fonte: Barros (1999)

Eixo Ântero-Posterior do Crânio

Para esta medida considerou-se a linha média que vai da extremidade do focinho até o ponto de interceção com outra linha perpendicular imaginária. O animal foi contido pelo pesquisador com uma das mãos, onde a cabeça do mesmo foi mantida entre os dedos indicador e o polegar. A medida foi realizada em milímetros (mm), (Fig. 2.1).

Figura 3 - Eixo Ântero-posterior



Fonte: Barros (1999)

Eixo Longitudinal

Para esta medida o pesquisador conteve o animal em decúbito ventral com os dedos anelar, médio e indicador. O focinho e a base da cauda eram marcados com caneta, logo após fazia-se a medida da distância entre os pontos em milímetros (mm), (Fig. 2.2).

Figura 4 - Eixo Longitudinal



Fonte: Barros (1999)

Comprimento da Cauda:

Nesta medida o avaliador segurou o animal com uma das mãos posicionando sua cauda sobre uma base plana e lisa (mesa), foi feita uma marcação com caneta na extremidade da cauda e realizada a medida em mm (Fig.2.3).

Figura 5 – Comprimento da Cauda



Fonte: Barros (1999)

5.4.3 Ontogênese de reflexos

Os filhotes machos foram analisados dos 1º ao 21º DPN às 14h, quanto ao desenvolvimento dos reflexos de: preensão palmar, recuperação de decúbito, colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício, resposta ao susto, geotaxia negativa, queda livre, bar holding (SMART e DOBBING, 1971a e FOX, 1965).

O dia da maturação do reflexo foi consolidado no primeiro dia de três dias consecutivos em que o animal realizava a resposta reflexa esperada, os instrumentos utilizados serão descritos abaixo:

Preensão Palmar:

Com auxílio de um bastonete de metal de aproximadamente 5cm de comprimento por 1mm de diâmetro, foi realizada uma leve aproximação na palma da pata dianteira esquerda do animal, a resposta foi positiva quando havia flexão rápida dos dedos após duas tentativas (Fig.3).

Figura 6 – Preensão Palmar



Fonte: Barros (1999)

Recuperação de Decúbito:

O animal foi colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana (mesa). Foi considerado resposta positiva, quando o animal girou o corpo e assumiu o decúbito ventral apoiado nas quatro patas, num período máximo de 10s (Fig. 3.1)

Figura 7 – Recuperação de Decúbito



Fonte: Barros (1999)

Colocação Pelas Vibrissas:

O avaliador suspendeu o animal pela cauda de tal forma que suas vibrissas tocaram levemente a borda de uma mesa. A resposta foi positiva, quando o animal, no tempo máximo de 10s, colocou as patas anteriores sobre a mesa tentando caminhar (Fig. 3.2).

Figura 8 - Colocação Pelas Vibrissas



Fonte: Barros (1999)

Resposta ao Susto:

Com o auxílio de um bastão metálico sobre um recipiente (4,5 cm de diâmetro x 6 cm de altura) também metálico e oco, o animal foi submetido a um estampido agudo. A resposta foi positiva quando o rato realizava a retração e imobilização do corpo de forma simultânea e rápida, caracterizando o susto (Fig.3.3).

Figura 9 – Resposta ao Susto



Fonte: Barros (1999)

Aversão ao Precipício:

As patas dianteiras do animal foram colocadas sobre a borda de uma superfície plana e alta (mesa) de maneira a detectar o precipício. A resposta positiva foi considerada quando o animal, no tempo máximo de 10s, deslocou 45º do precipício, caracterizando a aversão (Fig. 3.4).

Figura 10 – Aversão ao Precipício



Fonte: Barros (1999)

Geotaxia Negativa:

O animal foi colocado no centro de uma rampa de 45º de inclinação revestida com papel crepom, com a cabeça no sentido descendente. A resposta reflexa foi considerada positiva quando o animal, num período máximo de 10s, voltou-se completamente, girando o corpo em aproximadamente 140º, posicionando a cabeça em sentido ascendente (Fig. 3.5).

Figura 11 – Geotaxia Negativa



Fonte: Barros (1999)

Queda Livre:

O avaliador segurou o rato pelas quatro patas com o dorso voltado para baixo, a uma altura de 30 cm (uma régua de 30 cm, perpendicular ao plano serviu como guia). O animal foi então solto e observado sua queda livre sobre um leito de algodão (30 x 12 cm). A resposta foi positiva, quando o animal girou completamente o corpo, voltando o ventre para baixo, caindo na superfície apoiado sobre as quatro patas (Fig.3.6).

Figura 12 – Queda Livre



Fonte: Barros (1999)

Bar Holding:

O animal era colocado em cima de uma régua com 10cm de distância da superfície, a resposta foi positiva se em 10s o animal conseguia se equilibrar na régua sem cair (Fig.3.7).

Figura 13 – Bar Holding



Fonte: Barros (1999)

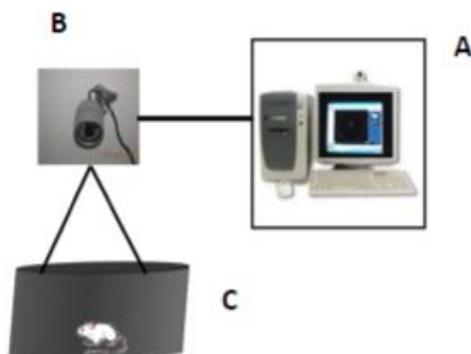
5.4.4 Atividade Locomotora:

A atividade locomotora foi realizada nos filhotes machos as 10h no 8°, 14°, 17°, 21° e 30° DPN. Neste estudo foi seguido o protocolo descrito por Aragão et al., 2011, para este teste foram considerados apenas ratos machos. Cada animal foi colocado individualmente no centro do campo aberto e teve seu deslocamento gravado durante 5 minutos. Os parâmetros analisados foram: distancia total, distância real, deslocamento rotacional, velocidade média, potência média, tempo de imobilidade, número de paradas, tempo parado/n° de paradas.

Um sistema de monitoramento em campo aberto circular ($\varnothing 1m$) foi usado, delimitado por paredes de 30 cm de altura, com superfícies internas de cor preta e em sua base uma superfície de EVA (etil vinil acetato) também preta, de forma que fosse obtido um contraste entre o animal e o campo usado. Uma câmera digital (VTR® 6638-CCTV System), com um sensor de infravermelho e LED de iluminação, fixada no teto a uma distância de 2,65m do solo e posicionada verticalmente ao centro do campo para filmar o animal enquanto este se movimentar. A câmera apresenta resolução de 420 linhas, velocidade de 1/60 e 1/100 s e sua sensibilidade permite registrar imagens

com iluminação mínima de até 0,1 lux. Para as filmagens foi utilizado o software Ulead VideoStudio® (ARAGÃO et al., 2011).

Figura 14 - A - Representação esquemática do Campo Aberto e do sistema de monitoramento; B – Câmera digital utilizada no registro das filmagens; C - 8: Imagem do rato no campo. Adaptado de Aragão et al., (2006).



Fonte – Aragão et al., (2006).

5.4.5 Estatística

Para comparação entre os diferentes grupos, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA) para dados paramétricos. O teste de normalidade utilizado foi Shapiro-Wilk. Para analisar o peso corporal, peso dos tecidos, reflexos, medidas murinométricas e atividade locomotora foi utilizado o Teste Two Way ANOVA, Tukey Pós Teste. Os dados foram expressos em média±desvio padrão. Em todos os casos a significância estatística foi considerada, admitindo-se um nível crítico de 5%. A análise dos dados foi realizada por meio do programa estatístico GraphPad Prism ® (Graph Pad Software, Inc, 2007, versão 6.0).

6 RESULTADOS

6.1 PESO CORPORAL

Não houve diferença entre os grupos experimentais em relação ao peso corporal dos filhotes machos [$F(3,32) = 0.47$] (fig.15) durante a lactação. Da mesma forma os tratamentos não alteraram o peso corporal de machos da prole aos 30 dias, respectivamente [$F(1,32) = 1.70$] (fig.16).

Gráfico 1 - Peso Corporal (1° ao 21° DPN)

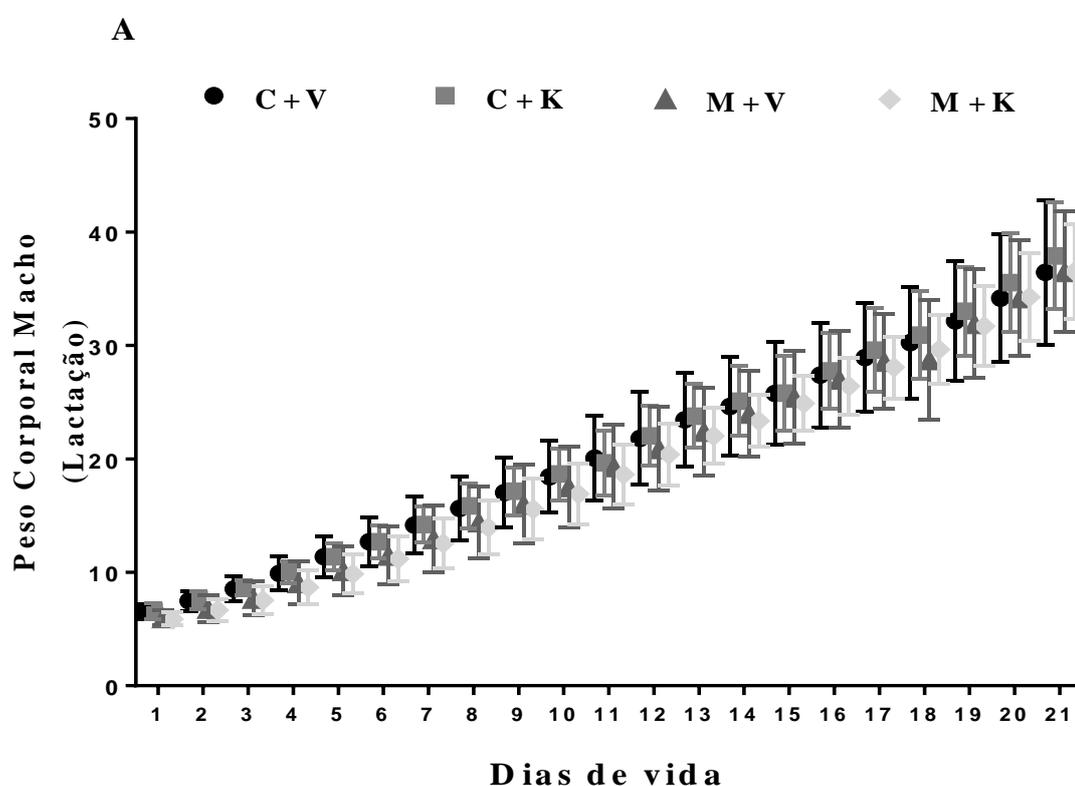


Gráfico 1: Peso Corporal na Lactação (1° ao 21° DPN) (A) Machos. Ratas *Wistar* gestantes receberam do 12° ao 14° dia de gestação injeção de azeite para compor o Grupo Controle (C, 0,5 ml/100g de peso corporal, i.p., N=10 ninhadas) ou injeção de Busulfan® diluído em azeite para compor o Grupo Microcefalia (M, 10 mg/kg, 0,5ml/100g de PC, i.p., N=8 ninhadas). Do 3° ao 7° DPN, para ambos os grupos experimentais, metade da ninhada (n=4filhotes) foi tratada com veículo DMSO (1ml DMSO 2,4% em solução salina) constituindo os subgrupos experimentais: C+V e M+V ou Kaempferol (14mg/kg, DMSO 2,4% v/v em solução salina), constituindo os subgrupos experimentais: C+K, e M+K. Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

Gráfico 2 - Peso Corporal aos 30 dias

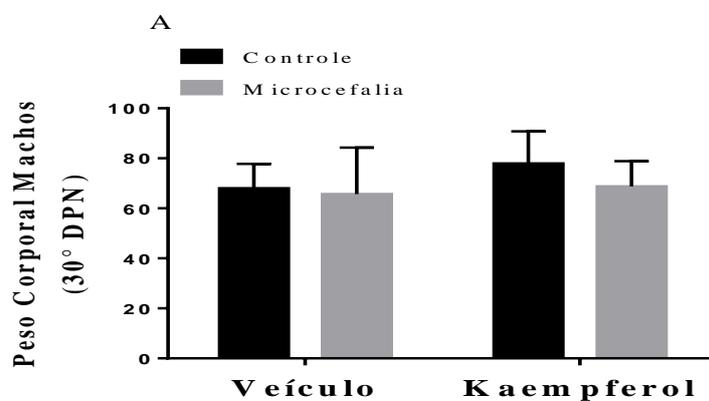


Gráfico 2: Peso Corporal aos 30 dias (A) Machos. Ratas *Wistar* gestantes receberam do 12° ao 14° dia de gestação injeção de azeite para compor o Grupo Controle (C, 0,5ml/100g de peso corporal, i.p., N=10 ninhadas) ou injeção de Busulfan® diluído em azeite para compor o Grupo Microcefalia (M, 10 mg/kg, 0,5mL/100g de PC, i.p., N=8 ninhadas). Do 3° ao 7° DPN, para ambos os grupos experimentais, metade da ninhada (n=4 filhotes) foi tratada com veículo DMSO (1ml DMSO 2,4% em solução salina) constituindo os subgrupos experimentais: C+V e M+V ou Kaempferol (14mg/kg, DMSO 2,4% v/v em solução salina), constituindo os subgrupos experimentais: C+K, e M+K. Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Tukey.

6.2 INDICADORES MURINOMÉTRICOS DO DESENVOLVIMENTO

As medidas murinométricas mensuradas foram utilizadas para analisar crescimento somático no período da lactação. A microcefalia provocou interação entre os grupos experimentais nos seguintes parâmetros: Eixo látero-lateral do crânio [$F(3,24) = 7.23$] ($p=0.001$) e comprimento da cauda [$F(3,22) = 8.104$] ($P=0.0008$).

A prole de machos do grupo M+V apresentou menor eixo ântero-posterior do crânio (EAPC) quando comparado ao controle C+V no 1° (C+V=20.06±0.89; n=7 vs *M+V=18.29±0.77; n=7) ($P=0.01$) e no 21° DPN, (C+V=38.08±2.90; n=7 vs ***M+V=35.68±2.13; n=7) ($P=0.0001$). O grupo C+K também apresentou diminuição do EAPC com relação ao grupo C+V no 21° dia (C+V=38.08±2.90; n=7 vs *C+K=36.49±1.12; n=8) ($P=0.01$). O eixo látero-lateral do crânio (ELLC) do grupo M+K foi menor que o do grupo C+K nos seguintes dias de lactação: 1° (C+K=10.27±0.25; n=7 vs *M+K=9.55±0.23; n=7) ($P=0.01$); 6° DPN (C+K=12.82±0.32; n=7 vs *M+K=12.00±0.36; n=7) ($P=0.01$); 15° (C+K=16.12±0.27; n=7 vs *M+K=15.34±0.41; n=7) ($P=0.01$) e no 21° (C+K=17.29±0.28; n=7 vs *M+K=16.59±0.67; n=7) ($P=0.01$). Já no 12° DPN, o grupo M+K apresentou diminuição do ELLC em comparação com o grupo M+V (M+V=16.76±0.93; n=7 vs *M+K=16.59±0.67; n=7) ($P=0.01$) (fig.19).

Os animais do grupo M+V apresentaram menor comprimento da cauda que os do grupo C+V no 9° (C+V=37.76±1.10; n=7 vs *M+V=33.84±2.97; n=6) ($P=0.01$) e 21° DPN (C+V=63.90±3.38; n=7 vs **M+V=58.87±4.31; n=6) ($P=0.001$). Adicionalmente, o grupo M+K obteve menor comprimento de cauda que o grupo C+K no 15° (C+K= 50.96±1.99; n=7 vs *M+K= 46.83±3.06; n=6) ($P=0.01$) e 21° DPN (C+K= 62.7±2.81; n=7 vs ***M+K= 57.26±1.45; n=6) ($P=0.0001$) (fig.17).

Gráfico 3 - Indicadores Murinométricos do Desenvolvimento (1° ao 21° DPN)

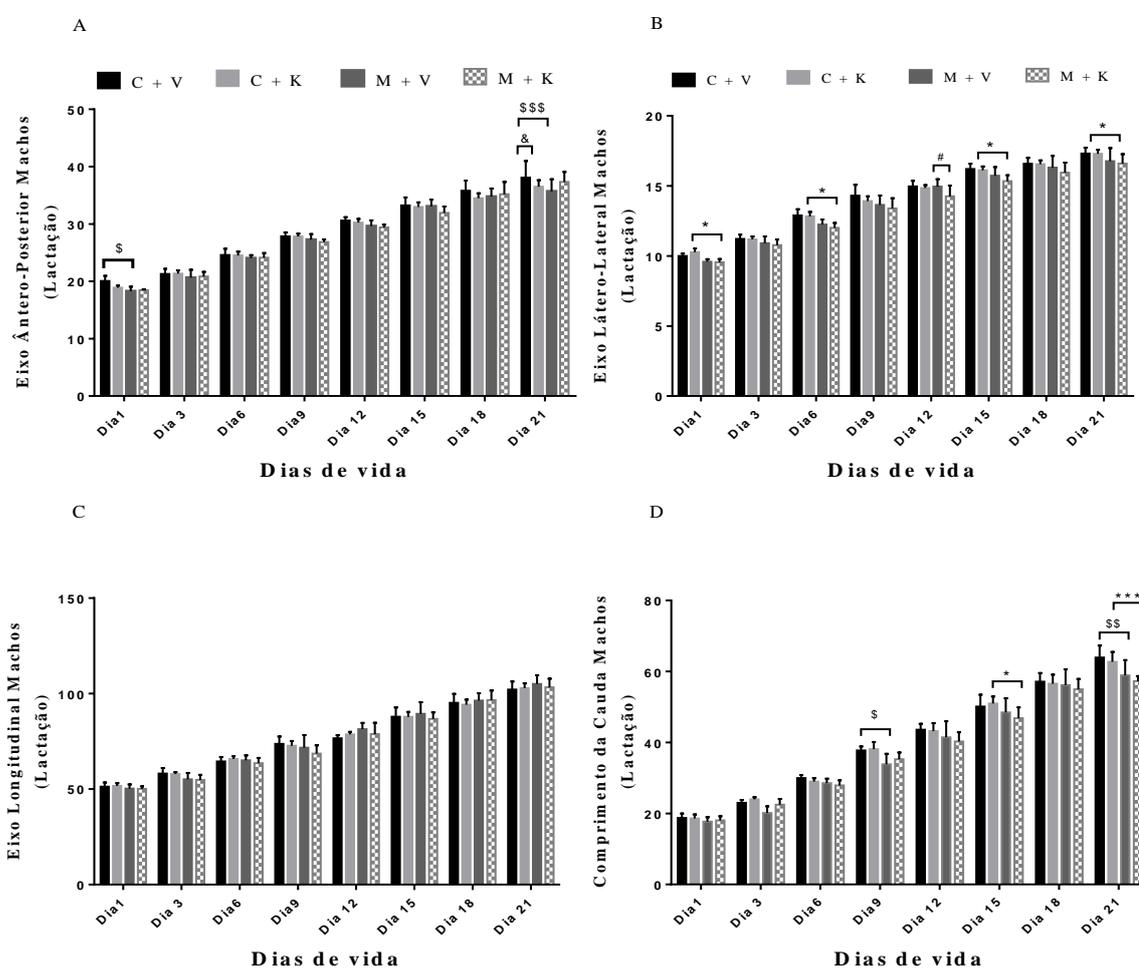


Gráfico 3: Indicadores Murinométricos do Desenvolvimento de ratos machos no 1°, 3°, 6°, 9°, 12°, 15°, 18° e 21° DPN: (A) Eixo Antero Posterior do Crânio, (B) Eixo Látero-Lateral do Crânio, (C) Eixo Longitudinal, (D) Comprimento da Cauda. Ratas *Wistar* gestantes receberam do 12° ao 14° dia de gestação injeção de azeite para compor o Grupo Controle (C, 0,5 ml/100g de peso corporal, i.p., N=10 ninhadas) ou injeção de Busulfan® diluído em azeite para compor o Grupo Microcefalia (M, 10 mg/kg, 0,5ml/100g de PC, i.p., N=8 ninhadas). Do 3° ao 7° DPN, para ambos os grupos experimentais, metade da ninhada (n=4filhotes) foi tratada com veículo DMSO (1ml DMSO 2,4% em solução salina) constituindo os subgrupos experimentais: C+V e M+V ou Kaempferol (14mg/kg, DMSO 2,4% v/v em solução salina), constituindo os subgrupos experimentais: C+K, e M+K. Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Turkey. *P=0.01; **P=0.001; ***P=0.0001, * Representa a diferença entre os grupos C+K e M+K, \$ diferença entre C+V e M+V, & diferença entre C+V e C+K, # diferença entre M+V e M+K.

6.3 PESO DOS TECIDOS

O peso dos tecidos aos 45 DPN revelou interação entre os grupos induzida pelo tratamento com Busulfan® apenas quando analisado o peso do encéfalo [F(1,26) =10.01] (P=0.0039). A comparação entre os grupos experimentais revelou unicamente diferenças entre os grupos M+K e C+K (C+K=1.673±0.061; n=9 vs *M+K=1.421±0.2002; n=6) (P=0.01) (Tab. 1). O peso relativo não verificou diferenças entre os grupos.

Tabela 1 - Peso absoluto dos Tecidos no 45° DPN

Tecidos (mg)	C+V(n=9)	C+K (n=9)	M+V (n=6)	M+K (n=6)
Encéfalo (mg)	1.56±0.20	1.67±0.06	1.42±0.18	1.42±0.20[#]
Sóleo dir.(mg)	0.06±0.01	0.06±0.01	0.06±0.00	0.06±0.08
Sóleo esq.(mg)	0.10±0.13	0.07±0.01	0.05±0.00	0.05±0.00
EDL dir. (mg)	0.08±0.09	0.05±0.01	0.05±0.00	0.05±0.00
EDL esq. (mg)	0.05±0.01	0.05±0.00	0.05±0.01	0.05±0.00

Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Turkey. *P=0.01; **P=0.001; ***P=0.0001, # Representa a diferença entre os grupos C+K e M+K.

Tabela 2 - Peso relativo dos Tecidos no 45° DPN

Tecidos (mg*1000)	C+V(n=9)	C+K (n=9)	M+V (n=6)	M+K (n=6)
Encéfalo	10,59 ± 1,51	10.28±0.85	10.51±1.20	10.84±1.25
Sóleo dir.	0,39± 0,07	0.39±0.03	0.44±0.03	0.46±0.04
Sóleo esq.	0.80±0.99	0.43±0.06	0.44±0.04	0.44±0.04
EDL dir.	0.37±0.06	0.34±0.05	0.37±0.03	0.40±0.03
EDL esq.	0.34±0.06	0.36±0.04	0.37±0.04	0.40±0.03

Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Turkey.

6.4 ONTOGÊNESE DE REFLEXOS

A microcefalia no período neonatal promoveu interação entre os filhotes machos que compuseram os grupos experimentais [$F(1,31) = 24,09$] ($p < 0.0001$). Os grupos M+V e M+K apresentaram retardo no desaparecimento do reflexo de preensão palmar em relação aos grupos C+V e C+K, respectivamente ($CV = 6.68 \pm 1.38; n = 10$ vs $*MV = 8.45 \pm 0.84; n = 7$) ($P = 0.01$), ($CK = 6.45 \pm 1.05, n = 10$ vs $**MK = 8.52 \pm 1.14, n = 8$) ($P = 0.001$). Para os reflexos de Colocação pelas vibrissas, Recuperação de decúbito, Aversão ao Precipício, Queda Livre, Resposta ao Susto, Geotaxia Negativa e Bar Holding não houve efeitos das manipulações com Busulfan® ou com Kaempferol entre os grupos experimentais (Fig.18).

Gráfico 4 - Ontogênese de Reflexos (1° ao 21° DPN)

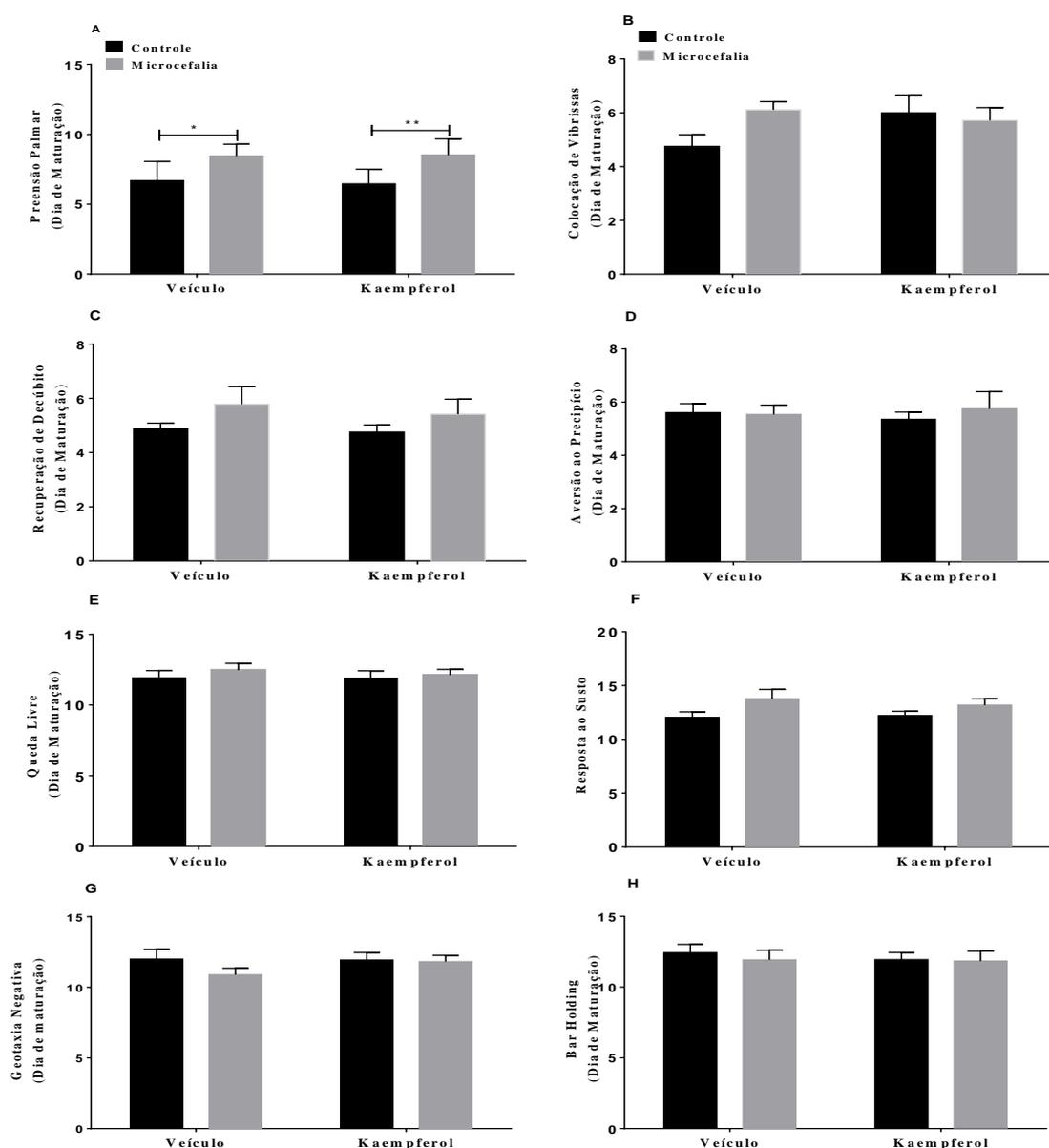


Gráfico 4: Ontogênese de Reflexos do 1° ao 21° DPN em ratos machos: (A) Prensão Palmar, (B) Colocação pelas vibrissas, (C) Recuperação de decúbito, (D) Aversão ao precipício, (E) Queda livre, (F) Resposta ao sustos, (G) Geotaxia negativa, (H) Bar holding. Ratas *Wistar* gestantes receberam do 12° ao 14° dia de gestação injeção de azeite para compor o Grupo Controle (C, 0,5 ml/100g de peso corporal, i.p., N=10 ninhadas) ou injeção de Busulfan® diluído em azeite para compor o Grupo Microcefalia (M, 10 mg/kg, 0,5ml/100g de PC, i.p., N=8 ninhadas). Do 3° ao 7° DPN, para ambos os grupos experimentais, metade da ninhada (n=4filhotes) foi tratada com veículo DMSO (1ml DMSO 2,4% em solução salina) constituindo os subgrupos experimentais: C+V e M+V ou Kaempferol (14mg/kg, DMSO 2,4% v/v em solução salina), constituindo os subgrupos experimentais: C+K, e M+K. Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Turkey. *P=0.01; **P=0.001; ***P=0.0001, * Representa a diferença entre os grupos.

6.6 ATIVIDADE LOCOMOTORA

O grupo M+V percorreu uma maior distância que o grupo C+V no 17° DPN (C+V= 15.18±11.30; n=10 vs *M+V=25.95±11.66; n=8) (P=0.01) e o grupo o grupo M+K apresentou maior distância percorrida que o grupo C+K no 21° DPN (C+K=13.68±7.915; n=10 vs ***M+K=29.83±8.860; n=8) (P=0.0001). Em termos de velocidade média, o grupo M+K foi mais veloz que o grupo C+K no 21° dia (C+K=12±0.039; n=10 vs **M+K=0.16±0.037; n=8) (P=0.001). A potência média do grupo M+K foi maior que a do grupo C+K no 21° DPN (C+K=0.22±0.152; n=10 vs ***M+K=0.72±0.383; n=8) (P=0.0001). O grupo M+V demonstrou menor tempo parado que o grupo C+V no 17° DPN (C+V= 199.2±40.937; n=10 vs *M+V=150.9±32.992; n=8) (P=0.01) (Tab. 3).

Tabela 3 - Atividade Locomotora nos dias 8, 14, 17, 21 e 30 DPN.

Parâmetros	Idade	C+V(n=10)	C+K (n=10)	M+V (n=8)	M+K (n=8)
Distância Total (m)	8	2.59±1.86	2.54±0.87	3.11±1.09	2.16±0.57
	14	5.09±2.76	7.94±4.66	8.75±4.16	4.97±3.52
	17	23.27±8.09	20.02±5.26	29.77±10.93[§]	24.58±6.17
	21	25.37±2.96	17.16±5.50	26.27±5.58	31.76±8.37^{###}
	30	30.47±3.16	27.81±5.92	27.01±5.65	32.96±2.96
Velocidade Média (m/s)	8	0.04±0.02	0.03±0.01	0.03±0.02	0.02±0.008
	14	0.09±0.03	0.08±0.03	0.09±0.03	0.06±0.03
	17	0.12±0.04	0.12±0.04	0.15±0.04	0.14±0.04
	21	0.15±0.02	0.12±0.04	0.16±0.02	0.16±0.04^{##}
	30	0.18±0.02	0.18±0.02	0.18±0.02	0.18±0.02
Potência Média (mW)	8	0.05±0.006	0.02±0.001	0.02±0.002	0.01±0.005
	14	0.07±0.101	0.05±0.048	0.06±0.050	0.02±0.026
	17	0.20±0.180	0.19±0.132	0.37±0.295	0.26±0.175
	21	0.41±0.135	0.22±0.152	0.49±0.153	0.72±0.383^{###}
	30	1.06±0.415	1.14±0.473	1.30±0.507	1.07±0.429
Tempo parado (s)	8	254.9±37.26	267.9±7.371	259.8±9.294	268.4±7.214
	14	223.6±40.76	222.1±33.56	225.2±28.533	251.6±31.327
	17	199.2±40.93	197.4±40.71	150.9±32.992[§]	173.4±37.012
	21	149.0±21.88	175.1±48.18	157.2±31.012	143.3±32752
	30	143.5±12.58	159.9±22.28	135.7±35.564	145.6±51.834

Dados expressos em MD±DP: Two Way ANOVA, pós-teste de Turkey. *P=0.01; **P=0.001; ***P=0.0001, § Representa a diferença entre os grupos C+V e M+V e # entre C+K e M+K

7 DISCUSSÃO

O presente estudo verificou que a administração gestacional de Busulfan[®], foi capaz de ocasionar redução das medidas dos eixos látero-lateral e ântero-posterior do crânio, bem como do comprimento da cauda em prole de ratos. O tratamento com este fármaco também promoveu redução do peso absoluto do encéfalo e atraso no desaparecimento do reflexo de preensão palmar nos animais. Por fim, a análise da atividade locomotora dos animais tratados com Busulfan[®] demonstrou aumento na distância total percorrida, velocidade média e potência média, bem como redução no tempo em que os animais estiveram parados. Já o tratamento neonatal com o polifenol kaempferol pareceu atrasar o aparecimento da hiperatividade nos animais tratados com Busulfan[®], no teste de atividade locomotora. Entretanto, não foi observado efeito do kaempferol sobre os demais parâmetros avaliados.

O tratamento gestacional com Busulfan[®] gerou na prole de ratos redução nos eixos látero-lateral e ântero-posterior do crânio, o que pode ser indicativos de redução encefálica (MILLER; GERMAN, 1999) validando este modelo experimental de micricefalia. Semelhantemente humanos que apresentam diminuição da circunferência da cabeça sinalizam para um tamanho do cérebro reduzido o que significa a presença da microcefalia (DOLK, 1991). Ao realizar tratamento gestacional com Busulfan[®] utilizando método idêntico ao utilizado pelo presente estudo, além do reduzido tamanho do crânio, foram identificadas desordens da migração neuronal em ratos (FURUKAWA, *et al.* 2007). Segundo o estudo de FURUKAWA, *et al.* (2007) tais desordens podem ser consideradas uma das causas de microcefalia em animais devido a morte celular excessiva no córtex cerebral (FURUKAWA, *et al.* 2007).

A migração neuronal ocorre precocemente durante o período embrionário e fetal (ZIPURSKY; GRESSENS, 2000). Em humanos, a migração de neurônios neocorticais ocorre entre a décima segunda e a vigésima quarta semana de gestação (ZIPURSKY; GRESSENS, 2000). Já em roedores, ocorre do décimo segundo dia de vida embrionário até o primeiro dia pós-natal (ZIPURSKY; GRESSENS, 2000). No decorrer da neocortigênese, os neurônios derivam do neuroepitélio primitivo e migram para a posição apropriada no manto cerebral (ZIPURSKY; GRESSENS, 2000). O período

em que os primeiros neurônios pós-mitóticos produzidos no neuroepitélio migram para formar uma pré-placa subpial é altamente sensível a diversos efeitos físicos, biológicos e químicos. Este pode ser um dos motivos pelo qual, no presente estudo, o Busulfan[®] ocasionou sinais encefálicos de microcefalia já que ele foi administrado no décimo segundo dia gestacional, período em que se inicia a migração de neurônios corticais (ZIPURSKY; GRESSENS, 2000; FURUKAWA, *et al.* 2007). Adicionalmente, estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa relatou prejuízo no desenvolvimento cortical pós-natal após administração gestacional de Busulfan[®] ao evidenciar diminuição dos parâmetros morfométricos do córtex motor e somatossensorial (GOUVEIA *et al.*, 2020), corroborando com o estudo de FURUKAWA, *et al.* (2007) que afirma que a apoptose excessiva poderia gerar distúrbios da migração neuronal no córtex contribuindo para o surgimento da microcefalia (FURUKAWA, *et al.* 2007).

Com relação a ontogênese de reflexos, este estudo observou atraso no desaparecimento do reflexo de preensão palmar, que é considerado um reflexo primitivo, portanto ele está presente ao nascimento do animal e desaparece de acordo com o crescimento do mesmo (ADLARD and DOBING, 1971). Os reflexos são respostas motoras do sistema nervoso central em meio a estímulos externos ou internos, desta forma, o desenvolvimento e maturação cerebral podem ser representados pela ontogênese de reflexos (ZEHR; STEIN, 1999). O surgimento destas respostas obedece a uma sequência predeterminada que evolui conforme o animal vai se desenvolvendo (FOX, 1965; SMART and DOBBING, 1971). A maturação de algumas estruturas cerebrais está intimamente envolvida no aparecimento dos reflexos e, neste contexto, a preensão palmar parece ser mediada por um mecanismo de reflexo espinhal (ALLAM, 2008; FUTAGI; TORIBE; SUZUKI, 2012). Em crianças, a ausência do reflexo de preensão palmar pode refletir comprometimento periférico ou da medula espinhal (FUTAGI; TORIBE; SUZUKI, 2012). O cérebro imaturo de neonatos e recém-nascidos não possui domínio suficiente do mecanismo espinhal, por este motivo os reflexos de preensão aparecem no início da vida e desaparecem gradualmente com a idade, acompanhando a maturação cerebral (FUTAGI, Y. *et al.*, 2012).

Alguns estudos demonstraram que a etiologia do reflexo de preensão palmar pode advir de lesões do córtex frontal medial ou lateral anterior a área motora primária, ou seja, a área motora suplementar, córtex pré-motor e córtex motor cingulado (FUTAGI, Y. et al., 2012; SCHOTT; 2002). Estudo verificou que pacientes com lesão na área motora suplementar exibiam reflexo de preensão principalmente na mão contralateral a lesão (HASHMOTO, 1998). Esta região é principalmente ligada a tarefas motoras relativamente simples como movimentos distais e proximais dos membros, porém também pode estar associada a realização de atividades motoras complexas (TANJI, 1994). Estes dados sugerem mais uma vez que a manipulação farmacológica com Busulfan® pode estar atrelada a um prejuízo no desenvolvimento do córtex cerebral.

Apesar dos polifenóis demonstrarem ter capacidade de aumentar níveis de serotonina encéfálica (SARUBBO et al., 2017; YAN et al., 2015), o presente estudo não encontrou efeito do polifenol *Kaempferol* ao nível macroscópico no peso corporal e encefálico nem sobre as medidas murinométricas e ontogênese de reflexos nos animais submetidos ao tratamento farmacológico gestacional com Busulfan®. Tal ausência de efeitos pode ter acontecido porque o *Kaempferol* não foi utilizado como um agente preventivo (SAMAD et al., 2018; LAGOA, 2009). Por exemplo, estudo conduzido por LAGOA et al. (2009) demonstrou que o *kaempferol* protegeu contra neurodegeneração no núcleo estriado de ratos quando utilizado nas doses de 14 e 21mg/kg, administradas 30 minutos antes da administração do ácido 3-nitropropiónico, substância capaz de promover neurodegeneração no estriado (LAGOA, 2009). Já o estudo de SAMAD et al. (2018) demonstrou que a administração de quercetina, 14 dias antes da indução de estresse por imobilização em camundongos, foi capaz de reverter ansiedade e depressão induzidas pelo estresse. Neste estudo, a indução da microcefalia realizada na gestação e o uso do polifenol apenas durante a lactação, quando o dano já estava instalado, pode ter sido a razão de não terem sido observados efeitos do tratamento com kaempferol sobre aspectos murinométricos e ontogênese de reflexos.

Este trabalho também demonstrou maior atividade locomotora, via teste de campo aberto, entre os animais que receberam Busulfan®. Para que a locomoção seja eficaz é necessária uma integração entre o sistema musculoesquelético suficientemente

desenvolvido, controle neural do movimento e controle postural eficiente (JAMON, 2006). Para que haja locomoção são indispensáveis o controle motor e controle postural, o primeiro está relacionado com contrações rítmicas de membros e músculos do tronco que são controlados por um gerador de padrão central baseado em um circuito espinhal, já o controle postural acontece mais tardiamente e é responsável pela manutenção da postura para que o animal possa se locomover com eficiência (JAMON, 2006). Estudo que induziu microcefalia em ratos com o objetivo de verificar os efeitos do ambiente enriquecido sobre a atividade locomotora e atividade neuronal na amígdala observou que os ratos microcefálicos apresentavam hiperatividade no teste de campo aberto independentemente de estarem expostos a um ambiente enriquecido ou não (MATSUDA, *et al.* 2018). Sendo assim, MATSUDA, *et al.* (2018). sugeriram que houve atividade neuronal alterada na amígdala levando a um aumento da ansiedade nesses animais. Outro estudo que induziu microcefalia nos dias 12, 13, 14 ou 15 da gestação observou anormalidades nos movimentos do membro pélvico e membros anteriores nos ratos que foram induzidos a microcefalia nos dias gestacionais 12, 13 ou 14 (HASHMOTO, MIZUTANI, 1991). Os autores associaram essas desordens no movimento a uma lesão nos neurônios motores superiores que são encontrados no córtex cerebral responsável pelo movimento voluntário (HASHMOTO, MIZUTANI, 1991). Mais uma vez estudos indicaram que o córtex encefálico estaria envolvido na gênese da microcefalia em animais.

Por outro lado, a administração neonatal com kaempferol pareceu adiar o surgimento da hiperatividade nos animais tratados com Busulfan®, isto pode ter ocorrido devido ao potencial efeito modulador que alguns flavonoides exercem sobre neurotransmissores (SINGH, S. *et al.* 2018; Mohan, M, *et al.* 2009). Por exemplo, estudo com o objetivo de investigar a capacidade da quercetina em prevenir alterações em testes comportamentais em ratos submetidos a um modelo de desmielinização experimental verificou que houve uma recuperação locomotora nesses animais sugerindo prevenção da desmielinização (BECKMANN, D, *et al.*, 2014). Além disso, a quercetina impediu a inibição da atividade da acetilcolina, indicando proteção da neurotransmissão colinérgica (BECKMANN, D, *et al.*, 2014). A administração de quercetina em ratos submetidos a um modelo de doença de

Parkinson ainda demonstrou que houve atenuação do déficit motor bem como restauração dos níveis de neurotransmissores como serotonina, dopamina e norepinefrina nos animais tratados com o referido polifenol (SINGH, S *et al.* 2018). Melhoras no quadro de locomoção dos animais, também podem representar recuperação do estado de ansiedade (MEHTA, V. 2017). Estudo com o objetivo de avaliar o efeito da quercetina sobre estresse crônico em camundongos, verificou que a quercetina diminuiu os comportamentos semelhantes à ansiedade e à depressão ao mesmo tempo que aumentou atividade locomotora, demonstrada pelo aumento da exploração no teste de campo aberto (MEHTA, 2017). Portanto, podemos inferir que, neste estudo, o atraso no aparecimento da hiperatividade poderia significar redução na ansiedade e/ou reparação nos níveis de neurotransmissores na prole submetida à indução de microcefalia experimental e tratada com kaempferol.

8 CONCLUSÃO

O polifenol Kaempferol parece atrasar o aparecimento da hiperatividade nos animais submeidos a um modelo experimental de microcefalia, porém não foi capaz de reverter os danos nos demais parâmetros observados. O tratamento gestacional com Busulfan[®] promoveu prejuízo nos indicadores murinométricos do desenvolvimento, podendo estar associado à microcefalia principalmente por ter reduzido os eixos látero-lateral e ântero-posterior do crânio. O uso de Busulfan também pode ser associado a alterações no comportamento motor, o que foi demonstrado pela presença da hiperatividade identificada no teste de campo aberto e que pode estar atrelada a um prejuízo no córtex motor. Mais investigações devem ser feitas no sentido de compreender se tanto o Busulfan[®] quanto o Kaempferol podem modificar histomorfologicamente regiões encefálicas.

REFERÊNCIAS

- ADLARD, B.F.F. and DOBBING, J. Vulnerability of developing brain. III. Development of four enzymes in the brains of normal and undernourished rats. **Brai research**, v. 28, p. 97-107. 1971.
- ALTMAN, J.; et al. The Influence of Nutrition on Neural and Behavioral Development . II . Growth of Body and Brain in Infant Rats Using Different Techniques of Under nutrition. **Developmental psychobiology**, v. 4, n. May 1970, p. 55–70, 1971
- ALVES, L. V et al. Neurodevelopment of 24 children born in Brazil with congenital Zika syndrome in 2015 : a case series study. **BMJ Open**, v. 8, p. 1-5, 2018.
- AZMITIA, E. C; AKBARI, H. M; WHITAKER-AZMITIA. P. M; Prenatal cocaine. decreases the trophic factor S-100fl and induced microcephaly: reversal by postnatal 5-HT A receptor agonist. **Neuroscience letters**; v.170(1), p. 141-144; 1994.
- BANDARUK, Y. et al. Evaluation of the Inhibitory Effects of Quercetin-Related Flavonoids and Tea Catechins on the Monoamine Oxidase - A Reaction in Mouse Brain Mitochondria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, p. 10270-10277, 2012.
- BARET, P. et al. Dietary polyphenols preconditioning protects 3T3-L1 preadipocytes from mitochondrial alterations induced by oxidative stress. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, p. 167-174, 2013.
- BARBEAU. A.; DISEASE, P. S. The Pathogenesis of Parkinson ' s Disease : A New Hypothesis. **Pathogenesis of parkson's disease**, v. 87, p. 802–807, 1962.
- BARKER, D. J. P. et al. Fetal and placental size and risk of. p. 259–262, 1990.
- BARROS, L. D. et al. Long term effects of neonatal exposure to fluoxetine on energy balance : A systematic review of experimental studies. **European Journal of Pharmacology**, v. 833, n. September 2017, p. 298–306, 2018.
- BECKMANN, D.V. et al. Neuroprotective role os quercetin in locomotor activities and cholinergic neurotransmission in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. **Life Sciences**, v. 103, p. 79-87, 2014.
- BIOCHEMISTRY, A. Methylazoxymethanol : Methylation. n. 34220, p. 83–85, [s.d.].
- BRUMMELTE, S. et al. Department of Pediatrics University of British Columbia , Vancouver , BC , Canada Medicine , University of Southern California , Los Angeles , CA , USA . Corresponding Author : **NEUROSCIENCE**, 2016.
- BUGGIA. I; LOCATELLI. F; REGAZZI. M. B; ZECCA. M. BUSULFAN. **The Annals of Pharmacotherapy**, v.28, p.1055-1062, 1994.
- CORY, H. et al. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems : A Mini-

Review. v. 5, n. September, p. 1–9, 2018.

CABRAL, C. M. et al. Clinical-epidemiological description of live births with microcephaly in the state of Sergipe, Brazil, 2015. *Epidemiologia e Serviço de Saúde*, v. 26 n. 2, p. 245-254, 2017. Disponível em: http://www.scielo.org/scielo.php?pid=S223796222017000200245&script=sci_arttext. Acesso em: 04 Mar. 2020.

DING, S; LI, L; ZHOU, F. M. Presynaptic Serotonergic Gating of the Subthalamo nigral Glutamatergic Projection. **The Journal of Neuroscience**, v.33, p.4875-4885, 2013.

DOLK, H. THE PREDICTIVE VALUE O MICROCEPHALY DURING THE FIRST YEAR F LIFE F R MENTAL RETARDATION A SEVEN YEARS. 1991.

DOLY, S.; MADEIRA, A.; FISCHER, J.; BRISORGUEIL, M. J.; DAVAL, J. et al. The 5-HT_{2A} receptor is widely distributed in the rat spinal cord and mainly localized at the plasma membrane of postsynaptic receptors. **J. Comp. Neurol.**, v. 472, p. 496 – 511, 2004.

DREISEITEL, A; KORTE, G; SCHREIER, P; OEHME, A; LOCHER, S; DOMANI, M; HAJAK, G; SAND, P. G. Berry anthocyanins and their aglycons inhibit monoamine oxidases A and B. **Pharmacological research**, v.59, p.306-311, 2009.

ECLAMC. Frequência de microcefalia ao nascimento no Brasil. Período 1982–2013. Buenos Aires: Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitales; 2015. Available from: <http://www.eclamc.org/microcefaliaarchivos.php>

FLOR et al. NEUROPSICOMOTOR DEVELOPMENT IN CHILDREN WITH MICROCONFALIA ASSOCIATED WITH ZIKA VIRUS. v. 7, n. 3, p. 313–318, 2017.

FOX, W. M. AND BEHAVIOURAL MOUSE DEVELOPMENT OF THE. 1965.

FRANCELE, M.; BARATA, O. Estudo de caso para o ensino. v. 2, n. 1, p. 212–227, 2018.

FUNAHASHI, A.; INOUE, M.; YAMAMURA, H. Acta Neuropathologica Developmental alteration of serotonin neurons in the raphe nucleus of rats with methylazoxymethano induced microcephaly. p. 31–38, 1992.

FURUKAWA, S. et al. Microencephaly and microphthalmia in rat fetuses by busulfan. p. 389–397, 2007.

FUTAGI, Y.; TORIBE, Y.; SUZUKI, Y. The Grasp Reflex and Moro Reflex in Infants : Hierarchy of Primitive Reflex Responses. *International Journal of Pediatrics*, v. 2012, p. 1-10. 2012.

GANZER, P. D. et al. PT. Serotonin Receptor and Dendritic Plasticity in the Spinal Cord Following Chronic Serotonergic Pharmacotherapy Combined with Exercise Following Complete SCI in the Adult Rat. **Experimental Neurology**, 2018.

GIDARO, M. C. et al. Kaempferol as Selective Human MAO-A Inhibitor : Analytical Detection in Calabrian Red Wines , Biological and Molecular Modelling Studies

Kaempferol as Selective Human MAO-A Inhibitor : Analytical Detection in Calabrian Red Wines , Biological and Molecular Modelling Studies. 2016.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. The developmental origins of health and disease : an overview. p. 2–6, 2017.

GOMEZ-PINILLA, F.; NGUYEN, T. T. J. Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. **Nutritional Neuroscience**, v. 15, n. 3, p. 127–133, 19 maio 2012.

GOUVEIA, H. J. C. B. et al. Maternal exposure to busulfan reduces the cell number in the somatosensory cortex associated with delayed somatic and reflex maturation in neonatal rats. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 103, n. July 2019, p. 101710, 2020.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. The thrifty phenotype hypothesis. p. 5–20, 2001.

HALES and BARKER. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**. v. 2, 1992.

HACHOUMI, L and SILLAR, KT*. Developmental stage-dependent switching in the neuromodulation of vertebrate locomotor central pattern generator networks. p. 0–3, 2019.

HASHMOTO, R. TANAKA, Y. Contribution of the Supplementary Motor Area and Anterior Cingulate Gyrus to Pathological Grasping Phenomena. **Eur neurol**, v. 40, p. 151-158. 1998.

HASHMOTO, Y and MIZUTANI, M. Early neurobehavioral disorders in the micrencephalic offspring induced by prenatal treatment with n-methyl-n-nitrosourea or methylazoxymethanol in the rat. *J. Vet. Med. Sci*, v. 53, p. 643-649. 1991

JAMON, M. The early development of motor control in neonate rat. v. 5, p. 657–666, 2006.

KASUGA, F. The Endocrine Function of Rat of Germ Cells following Gonads with Reduced Busulphan Treatment Laboratory of Veterinary Physiology , Faculty of Agriculture , University of Tokyo. v. 33, n. 1, p. 105–115, 1986.

KAWASHIMA, T. The role of the serotonergic system in motor control. **Neuroscience Research**, v.129, p.32-39, 2017.

KOLB, B. and WHISHAW, I. Plasticity in the neocortex: mechanisms underlying recovery from early brain damage. **Progress in neurobiology**, v. 32, p. 235-276. 1989

LAGOA *et al.* Kaempferol protects against rat striatal degeneration induced by 3-nitropropionic acid. v. 111, p. 473-487, 2009.

LAUDER, J. M. Ontogeny of the Serotonergic System in the Rat: Serotonin as a Developmental Signal “. **ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, p.297-314. 1990.

MANACH, C; SCALBERT. A; MORAND. C; REMESY. C; JIMENEZ. L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr**, v.79, p.727-747, 2004.

MATSUDA, W. et al. Effects of environmental enrichment on the activity of the amygdala in micrencephalic rats exposed to a novel open field. *Congenit Anom (Kyoto)*, v. 58, p. 16-23. 2018.

MATSUMOTO. H; NAGATA. Y. Studies on Methylazoxymethanol: Methylation of Nucleic Acids in the Fetal Rat Brain. **Experimental biology and medicine**, v.132(1), p. 383-385, 1969.

McCANCE and WIDDOWSON. REVIEW LECTURE The determinants of growth and form. **Proc. R. Soc. Lond. B.** v. 185; p. 1-17. 1974

MEHTA, V. PARASHAR, A. UDAYABANU, M. Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and inflammatory stress. **Physiology & Behavior**, v. 171, p. 69-78, 2017.

MILLER, J. P.; GERMAN, R. Z. Protein Malnutrition Affects the Growth Trajectories of the Craniofacial Skeleton in Rats. n. February 1999, p. 2061–2069, 2018.

MILLER, M. et al. The Effects of Protein Malnutrition on the Developing Central Nervous System in the R a t. v. 2, 1978.

MINER, J. J. et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise Article Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, p. 1–11, 2016.

Ministério da Saúde. **Orientações integradas de vigilância e atenção à saúde no âmbito da Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/12/orientacoes-integradas-vigilancia-atencao.pdf>>. 2017. Acesso em: 15/09/2017.

MIRANDA-FILHO, D. D. B. et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. v. 106, n. 4, p. 598–600, 2016.

MITRA, A. K. EFFECT OF AGING ON TRYPTOPHAN HYDROXYLASE IN RAT BRAIN : IMPLICATIONS ON SEROTONIN LEVEL. v. 28, n. 9, p. 1038–1042, 2000.

Mohan M, Jadhav SS, Kasture VS, Kasture SB. Effect of myricetin on behavioral paradigms of anxiety, v. 47, p. 927-931. 2009.

MOORE, C. A. et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. **Clinical review e education**, v. 171, p. 288-295. 2017.

NAGAI H. Bull. Effects of transplacentally injected alkylating agents upon development of embryos. Appearance of intrauterine death and mesodermal malformation. **Tokyo Dent. Coll**, v. 13, p. 103-119, 1972

NAVABI. S. M; DAGLIA. M; BRAIDY. N; NAVABI. S. F. Natural products, micronutrients, and nutraceuticals for the treatment of depression: A short review. **Nutritional Neuroscience**, v.0, p.1-15, 2015.

NISHIGORI, H. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors and risk of major congenital anomalies for pregnancies in Japan : A nationwide birth cohort study of the Japan Environment and Children ' s Study. p. 72–78, 2017.

OGAWA, M.; MIYATA, T. The reeler Gene-Associated Antigen on Cajal-Retzius Neurons Is a Crucial Molecule for Laminar Organization of Cortical Neurons. v. 14, p. 899–912, 1995.

PARK, S. H.; SIM, Y. B.; HAN, P. L.; LEE, J. K.; SUH, H. W. Antidepressant-like Effect of Kaempferol and Quercetin, Isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Exp Neurobiol**, v. 19 p. 30-38, 2010.

PHELPS, CH. Neural plasticity in aging and Alzheimer's disease: some selected comments. **Progress in brain research**, v. 86, p. 3-9, 1990.

RAVELLI, GP. et al. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. **The new England journal of medicine**, v. 295 p. 349-353, 1976

RICE, D.; JR, S. B. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System : Evidence from Humans and Animal Models *Birth* . v. 108, n. January, 2000.

ROCK, L. et al. Toxicological review of busulfan (Myleran). v. 168, p. 15–45, 1986.

SAMAD, N. et al. Quercetin Protects Against Stress-Induced Anxiety- and Depression-Like Behavior and Improves Memory in Male Mice. v. 8408, p. 795–808, 2018.

SARUBBO, F. et al. Chronic Silymarin , Quercetin and Naringenin Treatments Increase Monoamines Synthesis and Hippocampal Sirt1 Levels Improving Cognition in Aged Rats. 2017.

SASAKI-ADAMS, D. M.; KELLEY, A. E.; PH, D. Serotonin-Dopamine Interactions in the Control of Conditioned Reinforcement and Motor Behavior. n. December 2000, 2001.

SCHOTT, J. M.; ROSSOR, M. N. The grasp and other primitive reflexes. p. 558–560, 2002.

Singh S, Kumar P. Piperine in combination with quercetin halt 6-OHDA induced neurodegeneration in experimental rats: Biochemical and neurochemical evidences. **Neurosci Res**, v. 133, p. 38-47. 2018.

SLOLEY. B. D; URICHUK. L. J; MORLEY. P; DURKIN. J; SHAN. J. J; PANG. P. K. T; COUTTS. R. T. Identification of Kaempferol as a Monoamine Oxidase Inhibitor and Potential Neuroprotectant in Extracts of Ginkgo Biloba Leaves. **J. Pharm. Pharmacol**, v.52, p.451-459, 2000

SMART and DOLBING; PLACE, Y. Vulnerability of developing brain effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. v.

28, p. 85–95, 1971.

STEVANOVIC, T.; DIOUF, P. N.; GARCIA-PEREZ, M. E. Bioactive Polyphenols from Healthy Diets and Forest Biomass. p. 264–295, 2009.

TANJI, J. Review article The supplementary motor area in the cerebral cortex. v. 0102, n. 94, 1994.

UEDA, S.; NISHIMURA, C. A. A. Delayed 5-HT release in the developing cortex of microencephalic rats. v. 10, n. 6, p. 1215–1219, 1999.

VELASQUEZ, J. C.; GOEDEN, N.; BONNIN, A. Placental serotonin : implications for the developmental effects of SSRIs and maternal depression. v. 7, n. April, p. 1–7, 2013.

VITALIS, T.; PARNAVELAS, J. G. The Role of Serotonin in Early Cortical Development. p. 245–256, 2003.

WELLS, J. C. K. and disease ' Historical cohort studies and the early origins of disease hypothesis : making sense of the evidence Proceedings of the Nutrition Society Proceedings of the Nutrition Society. n. February, p. 179–188, 2009.

WELLS, J. C. K. Review Article The Thrifty Phenotype : An Adaptation in Growth or Metabolism ? v. 75, n. March 2010, p. 65–75, 2011.

West-Eberhard, M. J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **J Exp Zool B Mol Dev E**, v. 304(6), p.610-618; 2005.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. v. 56, n. 5, p. 479–485, 2001.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. **Serotonin and Development 1**. [s.l.] Elsevier B.V., 2010. v. 21

WOODS. C. G. Human microcephaly. **Current Opinion in Neurobiology**, v.14, p.112-117, 2004.

World Health Organization (HO). **Microcephaly**. Disponível em: <<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/microcephaly>>. Acesso em: 15 de outubro de 2018.

YAN, S. et al. Studies on Anti-Depressant Activity of Four Flavonoids Isolated from *Apocynum venetum* Linn (Apocynaceae) Leaf in Mice. v. 14, n. December 2015, p. 2269–2277, 2015.

ZEHR, E. P.; STEIN, R. B. WHAT FUNCTIONS DO REFLEXES SERVE DURING HUMAN LOCOMOTION ? **Progress in neurobiology**, v. 58, n. 98, p. 185-205 1999.

ZHAO, X. et al. Fisetin exerts antihyperalgesic effect in a mouse model of neuropathic pain: engagement of spinal serotonergic system. **Scientific reports**, v. 5, p. 9043, mar. 2015.

ZHEN, L. et al. The antidepressant-like effect of fisetin involves the serotonergic and noradrenergic system. **Behavioural brain research**, v. 228, n. 2, p. 359–366, mar. 2012.

ZIPURSKY, A.; GRESSENS, P. The Developing Nervous System : A Series of Review Articles Mechanisms and Disturbances of Neuronal Migration. v. 48, n. 6, p. 725–730, 2000.

APÊNDICE – A ACTION OF FLAVONOLS ON THE SEROTONIN SYSTEM IN RODENT MODELS: A PRECLINICAL SYSTEMATIC REVIEW

1. INTRODUCTION

Serotonin (5-HT) is an essential neurotransmitter for neurodevelopment (1). In rodents, the first neurons of the serotonergic system appear between the 12nd and 15th days of embryonic life (2). In humans, the first neurons appear in the 5th embryonic week (3). Right after their genesis, serotonergic neurons send projections through the brain to primarily modulate the maturation of other neuronal circuits and make early functional synaptic connections (4).

Due to its participation in essential processes for brain development, such as neurogenesis, glycogenesis, migration and cell differentiation, any disturbance in the synaptic availability of 5-HT may generate consequences on the encephalic maturation (1). So, behavioral and psychiatric disorders may be related to both decreased and/or increased 5-HT levels (5,6). In rodents, lower serotonin signaling caused a reduction in locomotor activity, decreased social interaction and increased depression-like behavior, while higher 5-HT signaling led to reduced aggression, increased anxiety-like behavior and decreased exploratory behavior (7).

Experimental studies have shown that the use of polyphenols can alter serotonin levels through its antioxidant function and by inhibiting monoamine oxidase (MAO). (MITRA, 2000; BANDARUK *et al*, 2012). Regarding to the antioxidant function, enzymes that are essential for the synthesis of brain monoamines such as tryptophan hydroxylase (TPH) and tyrosine hydroxylase (TH) appear to be susceptible to oxidative damage (MITRA, 2000). In contrast, polyphenols protect the serotonergic system against oxidation (SARUBBO, 2017). In addition, the increase in serotonin levels can also be explained by the ability of polyphenols to decrease MAO activity (BANDARUK *et al*, 2012). Flavonoids are among the main MAO-inhibiting polyphenols (BANDARUK *et al*, 2012).

Depending on their chemical structure, polyphenols can be classified into stilbenes, phenolic acids, lignans and flavonoids (11). Flavonoids are further subdivided into the subclasses flavonols, flavones, flavonones, isoflavones, anthocyanidins and flavonols (11). Flavonols, on the other hand, are the flavonoids found in the greatest quantity in foods, being represented mainly by kaempferol, quercetin, myricetin, galangin and fisetin (11). Studies have shown that flavonols are able to regulate the serotonergic system as well as that they have antidepressant and anxiolytic functions (12,13). Therefore, this study aimed to investigate the effects of flavonoids on morphological, physiological and cellular aspects of the serotonergic system as well as on some behaviors regulated by this system.

2. METHODS

Initially, a systematic review protocol was published in (<http://www.dcn.ed.ac.uk/camarades/research.html#protocols>) on the online platform CAMARADES (Collaborative Approach to Meta-Analysis and Animal Data Revision of Experimental Studies) according to the SYRCLE (Systematic Review Center or Laboratory Animal Experimentation) (ref). The recommendations found in the list of items in the PRISMA systematic review and meta-analysis report (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) were followed for the preparation of this review (14).

2.1. Data acquisition and study selection

The search and selection of articles was carried out between January and March of 2019 by two independent reviewers (Mendonça, CR e Costa-de-Santana, BJR). A third evaluator (Galindo, LCM) was consulted in cases of divergence between the reviewers. The first phase of this review, corresponded to searches in the electronic databases: MEDLINE via PUBMED, Scopus, Web of science and LILACS, the studies were selected through their titles and abstracts according to the eligibility criteria. In the second phase, the previously selected texts were read for inclusion or exclusion in the systematic review; articles that met the pre-defined criteria in the

protocol were included in this review. Once again, the reviewers compared the selected articles by consulting the third reviewer, when necessary.

The search strategy included terms related to the intervention and results. The combination of the descriptors MeSH and DeCS:

- LILACS (DeCS) (flavonols [Words] and seroton* [Words]; quercetin [Words] and seroton* [Words]; kaempferol [Words] and seroton* [Words]; myricetin [Words] and seroton* [Words]; fisetin [Words] and seroton* [Words]; galangin [Words] and seroton* [Words]).

- Web of Science (MESH): TÓPICO: (flavonols) AND TÓPICO: (seroton*); TÓPICO: (quercetin) AND TÓPICO: (seroton*); TÓPICO: (kaempferol) AND TÓPICO: (seroton*); TÓPICO: (myricetin) AND TÓPICO: (seroton*); TÓPICO: (fisetin) AND TÓPICO: (seroton*); TÓPICO: (galangin-) AND TÓPICO: (seroton*).

- Scopus (MESH): ALL (flavonols) AND (seroton*); ALL (quercetin) AND (seroton*); ALL (kaempferol) AND (seroton*); ALL (myricetin) AND (seroton*); ALL (fisetin) AND (seroton*); ALL (galangin) AND (seroton*).

- PubMed (MESH): (flavonols) AND seroton*; (quercetin) AND seroton*; (kaempferol) AND seroton*; (myricetin) AND seroton*; (fisetin) AND seroton*; (galangin) AND seroton*. (flavonols, quercetin, kaempferol (s), myricetin, fisetin, galangin and serotonin) was used. there was no language or year restriction.

2.2. Inclusion and Exclusion Criteria

The research and selection of articles were carried out in two stages. The first corresponded to the removal of duplicates after the search and selection of studies by reading titles and abstracts. In the second phase, the full texts were read for inclusion or definitive exclusion.

Data extraction occurred after full reading of the studies. The collected data were: name of the first author; year of publication; population, gender and evaluation age; experimental flavonol; administration route, dose, dilution, intervention period, intervention age. In addition, morphological, physiological and cellular aspects of the serotonergic system as first outcomes were registered. The secondary outcomes also

were registred under the following terms: anxiety and depression-like behaviors; Locomotor Activity; Somatic Development; Reflex Ontogeny in rats or Mice.

2.3 Risk of Bias

To evaluate the risk of bias, the tool for animal studies by Syrcle's and the RevMan5.3 software developed for the preparation of Cochrane reviews (RevMan, version 5.3. Copenhagen: The Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration, 2014) were used (15).

To develop the risk of bias graph found, each study answered a table with 10 questions related to randomization, allocation, blinding and outcomes, the risk of bias in the article increases according to the number of negative responses, where the green sign represents low risk of bias, red represents high risk of bias and yellow represents uncertain risk of bias (Figure 2).

3. Results

From the searches in the electronic databases, 1583 studies were identified in the first step of the search on MEDLINE via Pubmed, Scopus, Web of Science e LILACS. Of these, 231 duplicates were removed and after reading of title and abstract of 1352, 1328 were excluded. Finally, after applying inclusion and exclusion criteria (as defined in the Methods section) and fully reading the 24 eligible texts, 18 studies were included in this review (Figure 1). For the selection of the studies, the Kappa index (concordance between reviewers) was equal to 0.9 (almost perfect agreement) (36)

3.1 Characteristics of Studies

The main characteristics of the included studies are described in Table 2. Of the 18 selected papers , 4 used C57BL/6J mice (20,21,29,31), 4 used Wistar rats (12,13,25,27), 3 used Spreague-dawley rats (24,26,28), 2 used ICR mice (30,32), 2 used Swiss mice (17,18), 1 used Swiss albino rats(22), 1 used Abino rats (23) e 1

study used mice but did not mention the lineage (19). All studies used male animals except Beckman, D. et al., 2014 (27) that used only females and Mohan, M. et al., 2009 (23), that used males and females.

The characteristics of the intervention were presented in Table 3. Quercetin was the most widely used flavonol, being used in 11 out of 18 studies (12,13,17–20,22,24,25,27,28). The kaempferol (19,26,29) and the ficetina (30–32) were utilized in 3 out of 18 studies each. Finally, the miricetina was administrated in 2 out of 18 studies (21,23). In terms of rout of administration, the oral route was the most used being related in 11 studies (8,9,25,26,12,14,17,18,21–23), the intraperitoneal route was done in 6 studies (13,18,19,21,24,28) and the intragastric route appears only in 1 study (12). Regarding the vehicle used for dilution, the Carboxymethylcellulose was used 8 studies (12,18,19,22,25,30–32), the ethanol was used in 2 studies (13,27) and the water was used in 2 studies (23,26). DMSO (28), NaCl (21), saline (17), deionized water (29) e corn oil (24) were used in only one study each.

3.2 Effects of Flavonols on Antidepressant Activity, Locomotor Activity and Serotonergic System

Regarding the effect of flavonol on antidepressant activity, all 8 studies that evaluated this outcome (13,17,19,21,22,30–32) demonstrated the administration of flavonols was able to decrease depression-like behavior (Table 4). In terms of an, anxiolytic activity 6 studies (13,22,23,28,29,31) demonstrate that flavonol was able to decrease anxiety-like behavior (Table 4). Of the 13 articles that evaluated locomotor activity, 7 demonstrated that flavonol did not alter this kind of activity (17,19,21,29–32). In 4 out of 13 studies, the flavonol was associated to increased locomotor activity (12,22,23,25), 1 out of 13 evidenciated locomotor activity normalized and 1 described blockaged or decreased hyperlocomotion (18).

The results regarding interaction between the serotonergic system and the use of flavonol are presented on Table 4. Of the 5 articles that evaluated Monoamine Oxidase activity 4 revealed decreased activity of this enzyme (20,28,31,32) and 1 did not find

differences in the characteristics of this enzyme (30). Of the 9 articles that evaluated serotonin levels and their metabolites, 6 showed increased levels of 5-HT (12,19,24,25,31,32); 4 cited reduction in the levels of serotonin metabolite, the 5-HIAA (12,13,19,24); 2 did not see any differences (26,28); 2 showed a decrease in the 5-HIAA /5-HT ratio (19,31) and 1 article showed decreased serotonin turnover (32). Regarding the changes of the serotonin receptor after treatment with flavonol, in the flavonol wasn't able to alter the 5-HT_{1A} receptor (29) and 1 demonstrated the action of flavonol on the 5-HT₂ receptor (23). Only 1 study evaluated the tryptophan hydroxylase enzyme activity (24), showing its increase of it.

3.3 Analysis of Risk of Bias

All authors were not clear about the randomization of the animals used to compose the experimental group. Baseline characteristics have been reported in all studies. None of the included studies give information about allocation concealment and random housing, regarding the blindness of the participants was reported in four studies (19,27,31,32). In addition to showing the results of the included analyzes only two articles reported blinding results evaluation (28,31) and four articles showing random outcome data (29,30,31,32), no other risk of bias was identified in the included studies.

4. Discussion

According to the results of this systematic review, flavonols were able to modify physiological aspects of the serotonergic system, increasing levels of serotonin and decreasing levels of its metabolite, the 5-hydroxy indolacetic acid (5-HIAA), especially in regions such as the hippocampus and striatum. According with most of the included studies in this review, the activity of the monoamine oxidase (MAO) enzyme, which is related to the availability of 5-HT, was decreased, while Tryptophan hydroxylase was increased in the hippocampus, striatum and pineal gland. Flavonols were also effective in modifying behaviors linked to the serotonergic system demonstrating their

antidepressant and anxiolytic activity. Regarding locomotor activity, selected studies have shown controversial results, however, in most studies there was no effect of flavonol on this parameter.

The included studies in this review revealed that the use of polyphenols was associated to higher 5-HT and lower 5-HIAA contents (12,13,19,24,25,31,32). It may occur through the antioxidant function of polyphenols or through the inhibition of the enzyme monoamine oxidase (31,33). O aumento nos níveis de 5-HT e diminuição nos níveis de 5-HIAA encontrados nesta revisão, podem se dar através da função antioxidante dos polifenóis ou pela inibição da enzima monoamina oxidase. Studies reveal that essential enzymes that act on the synthesis of brain monoamines such as tryptophan hydroxylase (TPH) and tyrosine hydroxylase (TH) are susceptible to oxidative stress (33,34). For instance, elderly rats had decrease and inactivation of TH in the substantia nigra plus an increase in the carbonyl group in this region, which indicates the presence of oxidative damage (33). Such damage may even be responsible for the inactivation of TH (33). Additionally, another study found that aging rats had decreased TPH activity in serotonergic regions such as the midbrain, pons and marrow and associated to rise in oxidation (34). Therefore, oxidative stress damages the serotonergic system by modulating the activity of enzymes responsible for the synthesis or degradation of 5-HT.

However, the mechanisms by which polyphenols can protect the serotonergic system are still unclear. Case in point, chronic treatment with resveratrol in elderly rats promoted an increase in the synthesis of serotonin, dopamine and noradrenaline (24). The content of 5-HT was increased in the hippocampus and striatum, while the dopamine was raised only in the striatum and noradrenaline had higher levels exclusively in the hippocampus, possibly due to the protective effect of resveratrol on the enzymes TPH and TH against the natural oxidation of aging (24). Specifically, the increased cerebral serotonin levels may also be explained by the ability of polyphenols in reducing the activity of MAO (31). A study that subjected mice to a neuropathic pain model, reported that chronic oral administration of fisetin (a type of flavonol) was able to dose-dependent inhibit MAO-A activity and, consequently, increase levels of 5-HT in the spinal cord (31). Therefore, not only protection against

oxidation, but also the inhibition of MAO-A may be related to higher serotonin levels. Furthermore, the decreased MAO levels seen in the results of this review may also indicate protection from oxidative damage (20, 28, 31, 32). An experimental study in rats demonstrated that hypoxia induced by chronic obstructive apnea was able to increase the activity of MAO-A in the hippocampus in the meantime that raised the indicators of reactive oxygen species and the proteins that express MAO-A, leading to deficiency of serotonin and neurodegeneration (35). So, flavonols are also able to prevent oxidation by inhibiting this enzyme.

In the studies included in the present study, flavonols were effective in reducing the expression of depression- and anxiety-like behaviors (13,17,19,21,22,23,28,29,30, 31,32). It is postulated that one of the causes of changes in emotional states is a encephalic drop in the levels of monoamines (eg serotonin, dopamine, norepinephrine (6,36). The serotonergic system has been extensively studied in an attempt to explain the pathogenesis of anxiety and depression once 5-HT receptors are found in brain structures that are related to fear, such as hippocampus, cortex and raphe nucleus (37). One of the most studied receptors is the 5-HT_{1A} and a negative regulation of this receptor has been associated with depression and anxiety (37). However, other receptors as 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} and 5-HT₃ have also been associated with those emotional states (37). In this sense, a study that investigated the antidepressant effect of Kaempferol and Quercetin once at a time, identified reduced immobility in the forced swim test and tail suspension test, meaning an improvement in the depression-like behavior of the animals. The same study also showed an raise in brain levels of 5-HT (19). Regarding the anxiety-like behavior, a study that induced immobilization stress in rats found that the administration of quercetin increased the time spent by stressed animals in the light part of the light/dark activity box test (13). Likewise, stressed animals had more time spent in the open arms of the elevated plus maze test, which means that the animals were less anxious. Such findings may be related to the antioxidant and inhibitor MAO effects (13).

Despite the variations in the results of the locomotor activity test, most studies showed no difference in this test. Interestingly, of 7 studies that did not observed flavonol action on locomotor activity and 6 out of 7 verified the presence of depression-

or anxiety-like behaviors (17,19,21,29,30,32). This may mean that flavonols are not psychostimulant compounds (stimulate activity) and that these drugs may produce a false positive result in tests that assessed depression- and anxiety-like behaviors in rats (38). On the other hand, 4 included studies (12, 22, 23, 25) identified that flavonols were able to increase the locomotor activity of animals which may be related to the neuroprotective function of polyphenols (39). Two out of 4 studies (12, 25) used a neurotoxin that damages dopaminergic neurons simulating a model similar to Parkinson's disease and reported that the improvement in locomotor activity may be due to its antioxidant activity, as well as may be related to increased levels of monoamines such as serotonin, norepinephrine and dopamine (39).

The included studies in this review point to the ability of flavonols to act as modulators of the serotonergic system by increasing 5-HT levels mainly through their antioxidant function protecting enzymes that participate in the metabolism of this monoamine and acting as an inhibitor of the enzyme monoamine oxidase (MAO). In addition flavonols seemed to be effective in ameliorating depression- and anxiety-like behaviors, however, more studies still are necessary to identify the activity of flavonols on locomotion. Therefore, it is important to further investigate better the flavonols once they have important functions on the serotonergic system and on regulation of emotional behaviors.

Referencias

1. Whitaker-azmitia PM. Serotonin and Development 1 [Internet]. Vol. 21. Elsevier B.V.; 2010. 309–323 p. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1569-7339\(10\)70086-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1569-7339(10)70086-2)
2. Lauderb JM. Ontogeny of the Serotonergic System in the Rat : Serotonin as a Developmental Signal “ .
3. Sundstrm E, Kare S, Souverbie F, Samuelsson E, Pschera H, Lunell N, et al. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. 1993;75:1–12.
4. Ogawa M, Miyata T. The reeler Gene-Associated Antigen on Cajal-Retzius Neurons Is a Crucial Molecule for Laminal Organization of Cortical Neurons. 1995;14:899–912.
5. Hranilovic D, Bujas-Petkovic Z, Vragovic R, Vuk T, Hock K, Jernej B. Hyperserotonemia in Adults with Autistic Disorder. 2007;37:1934–40.
6. Hughes JH, Gallagher P, Young AH. Effects of acute tryptophan depletion on cognitive function in euthymic bipolar patients. 2002;12:123–8.
7. Shah R, Courtiol E, Castellanos FX. Abnormal Serotonin Levels During Perinatal Development Lead to Behavioral Deficits in Adulthood. 2018;12(June):1–10.
8. Millard SJ, Weston-green K, Newell KA. Neuroscience and Biobehavioral Reviews The effects of maternal antidepressant use on offspring behaviour and brain development : Implications for risk of neurodevelopmental disorders. 2017;80(June):743–65.
9. Bostwick JM. USING SIDE EFFECTS TO TAILOR DEPRESSION TREATMENT REVIEW A Generalist ' s Guide to Treating Patients With Depression With an Emphasis on Using Side Effects to Tailor Antidepressant Therapy. Mayo Clin Proc [Internet]. 2010;85(6):538–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.4065/mcp.2009.0565>
10. Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems : A Mini-Review. 2018;5(September):1–9.
11. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jime L. Polyphenols: food sources and bioavailability 1,2. 2018;(February).
12. Singh S, Kumar P. Piperine in combination with quercetin halt 6-OHDA induced neurodegeneration in experimental rats: Biochemical and neurochemical evidences. Neurosci Res. 2018 Aug;133:38–47.
13. Samad N, Saleem A, Yasmin F, Shehzad MA. Quercetin Protects Against Stress-Induced Anxiety- and Depression- Like Behavior and Improves Memory in Male Mice. 2018;8408:795–808.

14. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, John PA. & reporting The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions : explanation and elaboration. 2009;
15. Hooijmans CR, Rovers MM, Vries RBM De, Leenaars M, Ritskes-hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE ' s risk of bias tool for animal studies. BMC Med Res Methodol [Internet]. 2014;14(1):1–9. Available from: BMC Medical Research Methodology
16. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data Published by: International Biometric Society Stable URL : <https://www.jstor.org/stable/2529310>. 2019;33(1):159–74.
17. Holzmann I, Mota L, Afonso J, Miranda V, Steimbach B, Souza MM De. Pharmacology , Biochemistry and Behavior Antidepressant-like effect of quercetin in bulbectomized mice and involvement of the antioxidant defenses , and the glutamatergic and oxidonitregic pathways. Pharmacol Biochem Behav [Internet]. 2015;136:55–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2015.07.003>
18. Kanazawa LKS, Vecchia DD, Wendler EM, Hocayen PDAS, Beirão PS, Mélo ML De, et al. Effects of acute and chronic quercetin administration on methylphenidate-induced hyperlocomotion and oxidative stress. Life Sci [Internet]. 2017;171:1–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2017.01.007>
19. Yan S, Lang J, Song Y, Wu Y, Lv M, Liu Y, et al. Studies on Anti-Depressant Activity of Four Flavonoids Isolated from *Apocynum venetum* Linn (Apocynaceae) Leaf in Mice. 2020;14(December 2015):2269–77.
20. S SYM, S AHB, Sakakibara H, Ph D, Kawabata K, Ph D, et al. Effect of quercetin and glucuronide metabolites on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria. Nutrition [Internet]. 2011;27(7–8):847–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2010.09.002>
21. Ma Z, Wang G, Cui L, Wang Q. Myricetin Attenuates Depressant-Like Behavior in Mice Subjected to Repeated Restraint Stress. 2015;(October):28377–85.
22. Mehta V, Parashar A, Udayabanu M. Physiology & Behavior Quercetin prevents chronic unpredictable stress induced behavioral dysfunction in mice by alleviating hippocampal oxidative and in fl ammatory stress. PHB [Internet]. 2017;171:69–78. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.006>
23. Mohan M, Jadhav SS, Kasture VS, Kasture SB. Effect of myricetin on behavioral paradigms of anxiety. 2009;47:927–31.
24. Sarubbo F, Ramis MR, Kienzer C, Aparicio S. Chronic Silymarin , Quercetin and Naringenin Treatments Increase Monoamines Synthesis and Hippocampal Sirt1 Levels Improving Cognition in Aged Rats. 2017;

25. Singh S, Jamwal S, Kumar P, Pharm M, Ph D, London FLS. Neuroprotective potential of Quercetin in combination with piperine. 2019;12(7):1137–44.
26. Sloley BD, Urichuk LJ, Morley P, Durkin J, Shan JJ, Pang PKT, Coutts RT. Identification of Kaempferol as a Monoamine Oxidase Inhibitor and Potential Neuroprotectant in Extracts of Ginkgo Biloba Leaves. 2000;52:451–9.
27. Beckmann D V, Carvalho FB, Mazzanti CM, Rosmarini P, Andrades AO, Aiello G, et al. Neuroprotective role of quercetin in locomotor activities and cholinergic neurotransmission in rats experimentally demyelinated with ethidium bromide. *Life Sci* [Internet]. 2014;103(2):79–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2014.03.033>
28. Chakraborty J, Singh R, Dutta D, Naskar A, Rajamma U, Mohanakumar KP. Quercetin improves behavioral deficiencies, restores astrocytes and microglia, and reduces serotonin metabolism in 3-nitropropionic acid-induced rat model of Huntington's Disease. *CNS Neurosci Ther*. 2014 Jan;20(1):10–9.
29. Grundmann O, Nakajima J, Kamata K, Seo S, Butterweck V. Kaempferol from the leaves of *Apocynum venetum* possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice. 2009;16:295–302.
30. Yu X, Jiang X, Zhang X, Chen Z, Xu L, Chen L, et al. The effects of fisetin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Metab Brain Dis* [Internet]. 2016 Oct 21 [cited 2019 Jan 11];31(5):1011–21. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11011-016-9839-5>
31. Zhao X, Wang C, Cui W-G, Ma Q, Zhou W-H. Fisetin exerts antihyperalgesic effect in a mouse model of neuropathic pain: engagement of spinal serotonergic system. *Sci Rep*. 2015 Mar;5:9043.
32. Zhen L, Zhu J, Zhao X, Huang W, An Y, Li S, et al. The antidepressant-like effect of fisetin involves the serotonergic and noradrenergic system. *Behav Brain Res*. 2012 Mar;228(2):359–66.
33. Cruz CPDELA, Revilla E, Venero JL, Ayala A, Cano J, Machado A. SUBSTANTIA NIGRA OF AGED RAT. 1996;20(1):53–61.
34. Mitra AK. EFFECT OF AGING ON TRYPTOPHAN HYDROXYLASE IN RAT BRAIN : IMPLICATIONS ON SEROTONIN LEVEL. 2000;28(9):1038–42.
35. Lam C, Li J, Tipoe GL, Youdim MBH, Fung L. Monoamine oxidase A upregulated by chronic intermittent hypoxia activates indoleamine 2 , 3-dioxygenase and neurodegeneration. 2017;1–21.
36. Farooqui T, Farooqui AA. Potential of Polyphenols in the Treatment of Major Depression. 2017;265–82.
37. Taylor C, Fricker AD, Devi LA, Gomes I. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. 2005;17:549–57.

38. Yi L, Li C, Zhan X, Cui C, Xiao F, Zhou L, et al. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the flavonoid naringenin in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* [Internet]. 2010;34(7):1223–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pnpbp.2010.06.024>
39. Daskalova E, Delchev S, Topolov M, Dimitrova S, Uzunova Y, Valcheva-kuzmanova S, et al. *Aronia melanocarpa* (Michx .) Elliot fruit juice reveals neuroprotective effect and improves cognitive and locomotor functions of aged rats. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2019;132(July):110674. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019>

Table 1. Eligibility criteria for inclusion of studies

	Inclusion criteria	Exclusion criteria
Population	Rodents any sex, at any stage of life.	No one
Intervention	Rodents submitted to treatment with flavonols quercetin, kaempferol, myricetin, fisetin and galangin by any administration way.	No one
Comparison	Rodents that were not treated with flavonols	No one
Outcomes	<p>Primary outcomes:</p> <p>Morphological, physiological and cellular aspects of the serotonergic system.</p> <p>Secondary Outcomes:</p> <p>Anxiety and depression-like behaviors; Locomotor Activity; Somatic Development; Reflex Ontogeny in rats or Mice.</p>	No one

Figure 1. Flowchart of the literature search and study selection for the systematic review, in accordance with the PRISMA statement (Software RevMan5.3) (14).

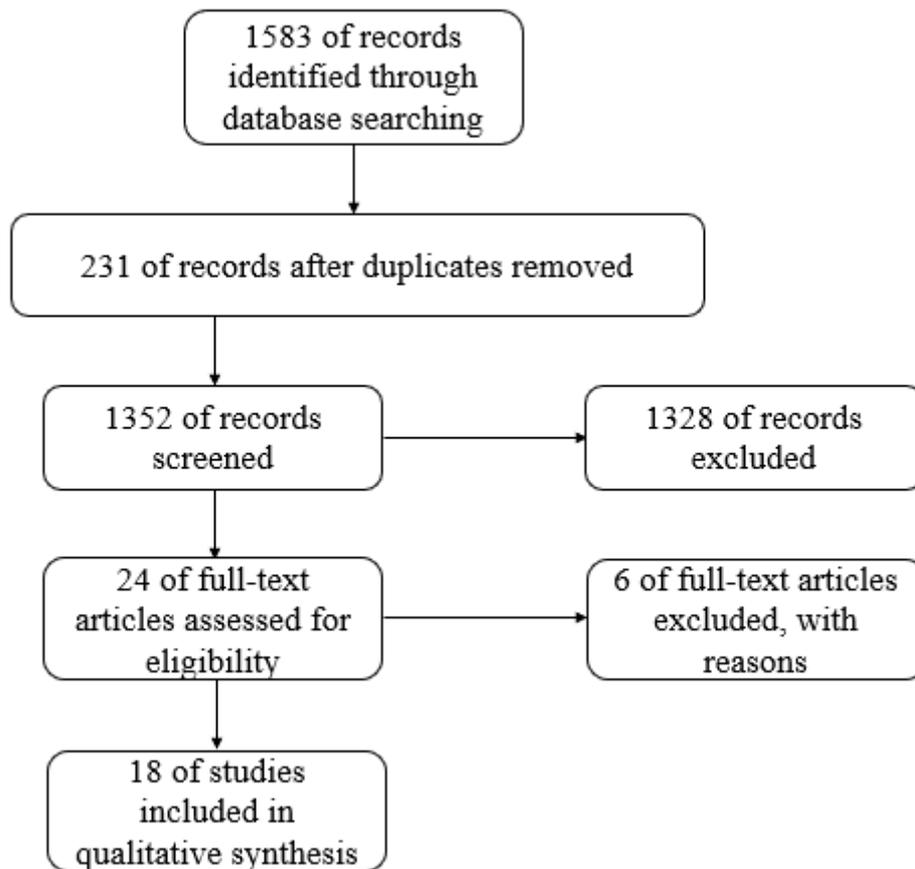


Figure 2. Graphic of risk of Bias in accordance with the PRISMA statement (Software RevMan5.3) (14).

	Random sequence generation (selection bias)	Baseline characteristics (selection bias)	Allocation concealment (selection bias)	Random housing (performance bias)	Blinding of participants and personnel (performance bias)	Random outcomes data (attrition bias)	Blinding of outcomes assessment (detection bias)	Incomplete outcomes data (attrition bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias
Beckman D, et al., 2014	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
Chakraborty J, et al., 2013	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Grundman O, et al., 2009	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
Holzman L, et al., 2015	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Kanazawa et al., 2017	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Ma Z, et al., 2013	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Mehta V, et al., 2017	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Moham M, et al., 2019	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Samad N, et al., 2018	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Sarubbo F, et al., 2017	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Singh S, et al., 2018	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Singh S, et al., 2017	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Sloley B, D., 2000	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Yan Shao-xiao, et al., 2015	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Yoshno S, M, S et al., 201	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Yu, X, et al., 2016	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Zhao X, et al., 2015	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Zhen L, et al., 2011	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+

Table 2. Characteristics of the selected studies

Author, year	Population	Gender	Evaluation age
Sarubbo, F. (2017) (24)	Sprague-Dawley rats	♂	18 months
Samad, N. (2018) (13)	Albino Wistar mice	♂	-
Yan, Shao-xiao (2015) (19)	Mice	♂	-
Chakraborty,joy (2013) (28)	Sprague-Dawley rats	♂	20-24 weeks
M.S. Yoshno Saki(2011) (20)	C57BL/6J mice	♂	6 weeks
Mehta, Vineet (2017) (22)	Swiss albino mice	♂	-
Kanazawa, Luiz (2017) (18)	Swiss mice	♂	-
Singh, S. (2017) (12)	Wistar rats	♂	-
Singh, S. (2018) (25)	Wistar rats	♂	-
Holzmann, Iandra (2015) (17)	Swiss mice	♀	-

Beckman, Diego (2014) (27)	Wistar rats	♂	85-95 days
Mohan, Mahalaxmi (2009) (23)	Albino mice and Albino rats	♂,♀	2-4 months
Grundmann, O. (2009) (29)	BL6/C57J mice	♂	6-12 weeks
SLOLEY, B. D. (2000) (26)	Sprague-Dawley rats	♂	-
YU, X. (2016) (30)	ICR mice	♂	6 weeks
ZHAO, X <i>et al</i> (2015) (31)	C57BL/6J mice	♂	6-7 weeks.
ZHEN, L. <i>et al.</i> (2011) (32)	ICR mice	♂	-
MA, Z. (2015) (21)	C57BL/6J mice	♂	-

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO

Journal of Chemical Neuroanatomy 103 (2020) 101710



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chemical Neuroanatomy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchemneu

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



Henrique J.C.B. Gouveia^a, Raul Manhães-de-Castro^b, Bárbara J.R. Costa-de-Santana^c,
Carolina R. Mendonça^a, Gláyciele Albuquerque^d, Diego Bulcão Visco^a, Diego Cabral Lacerda^a,
Ana Elisa Toscano^{a,*}

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

^b Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

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

^d Post Graduate Program in Physiotherapy, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

* Department of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Keyword:

Microcephaly

Rat

Central nervous system

Alkylating agents

Brain development

ABSTRACT

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

1. Introduction

In mammals, there are periods of development of physiological systems that are particularly vulnerable to physical, chemical and biological insults (Rice and Barone, 2000). This occurs because these periods, for example, gestation, are dependent on critical cellular processes that contribute to neural development (Rice and Barone, 2000). Although many processes occur after birth, many occur predominantly during pregnancy, such as neurogenesis, especially in humans, and neuronal migration (Riedler et al., 1980; Rice and Barone, 2000; Páris and Hovda, 2003). At this stage, exposure to harmful environmental factors like infections, malnutrition and teratogenic agents, such as

busulfan, can disrupt these processes and cause damage (Funkawa et al., 2007; Ashwal et al., 2009). Indeed, impaired neuronal migration is one of the major causes of microcephaly (Funkawa et al., 2007). Thus, it is important to evaluate how the damages caused during pregnancy can impair development after birth.

Busulfan is a bifunctional alkylating agent used initially for the treatment of chronic myelogenous leukemia (CML) due to its ability to cause DNA damage (Iwamoto et al., 2004; Ohim et al., 2013a). Owing to its reduction of adverse effects when compared to X-Rays, busulfan then began to be used for a conditioning regimen before a hematopoietic stem cell transplant (HSCT) (Tutschka et al., 1987). However, in rodent experiments, busulfan presented a potential teratogenic and

* Corresponding author at: Department of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, 55608-600 Vitória de Santo Antão, PE, Brazil.

Email address: altoscano@ufpe.br (A.E. Toscano).

<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.101710>

Received 2 July 2019; Received in revised form 1 November 2019; Accepted 1 November 2019

Available online 07 November 2019

0891-0618/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

cytotoxic effect (Bishop and Wasson, 1986). Furukawa et al. (2007) reported that busulfan caused microcephaly in fetuses of pregnant rats exposed to the substance at periods corresponding to the initial stage of development of the cerebral cortex. Increased apoptosis and inhibition of neural epithelial mitosis were highlighted as the inducers of hypoplasia in the brain, retina, and lens in fetuses (Furukawa et al., 2007).

Besides microcephaly, busulfan can still induce polydactyly and syndactyly (Naruse et al., 2007), abnormal development of molars (Mitomi et al., 2014), bone deficiencies (Otsuji et al., 2005), damage to neural progenitor cells (Ohira et al., 2013b) and presence of pyknotic cells in some tissues, including craniofacial tissue (Ohira et al., 2009). However, the available studies evaluated the effects of busulfan in two ways on fetuses after application during the gestation period (Otsuji et al., 2005; Furukawa et al., 2007; Naruse et al., 2007; Ohira et al., 2009) or directly on pups during the lactation period (Ohira et al., 2013a; Mitomi et al., 2014). No studies have been found to date that evaluated the effect of busulfan on lactation after pregnancy exposure. In addition, the studies that evaluated pups during the lactation period did not evaluate the damage associated with microcephaly in specific areas of the cerebral cortex (Ohira et al., 2013a, 2014). The objective of our study, then, was to evaluate the effects of busulfan exposure during pregnancy on somatic development and reflex and brain morphology in young rats. For this, we evaluated the following during the lactation period: somatic growth, maturation of physical features and reflex-ontogeny. Also, we aimed to evaluate the effects of busulfan on brain weight and cortical morphometry at 28 days of postnatal life. The rats were exposed to busulfan during the early developmental stage (days 12–14 of the gestational period). The results of this study will be useful to understand how the DNA alkylating agent, often used clinically, impairs the development of the central nervous system, even if it is not administered directly to the pups.

2. Methods

2.1. Animals

20 female Wistar albino rats (220–250 g) and 10 male Wistar rats (320–390 g) were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco. They were housed (2 females for 1 male). The day of conception was considered the day the spermatozoa were identified in the vaginal smear. The pregnant rats were randomly divided into two groups: control (C, $n = 10$), and busulfan (B, $n = 10$). Group B received busulfan (Sigma, 10 mg/kg/0.5 ml/100 g rat body weight), diluted in olive oil intraperitoneally (i.p.). The dose of 10 mg/kg had been previously reported to be effective in inducing microcephaly in rats (Furukawa et al., 2007) and is similar to previous research with humans (Matias et al., 2008). Group C received only olive oil (0.5 ml / 100 g rat body weight, i.p.). The rats were submitted to pharmacological manipulation once a day on gestational days 12, 13 and 14, the initial phase of cerebral cortex development (Furukawa et al., 2007).

Regarding the litters used, no significant difference was found between the groups regarding the average number of pups born (10.6 ± 1.5 in the busulfan group and 9.3 ± 1.9 in the control group, $p > 0.05$). Also, the percentage of females and males used for each experimental group was similar (48.6% and 43.9% of the control and busulfan group animals were female, respectively), decreasing the influence of sex differences in the results. Litters composed of 8–10 pups ($n = 10$ for both groups) were used to evaluate parameters. The litters were composed of males and females with similar body weights. After weaning, male and female rats were housed together, 3–4 animals per cage until day 28 (before the start of the fertile period). All animals were kept at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, an inverted light-reverse cycle of 12/12h (light 20:00h–08:00h). Food and water were offered ad libitum throughout the experiment. The Ethical Committee of the UFPE, Brazil

(Protocol 0040/2016) approved all experimental procedures. These experimental procedures followed the National Institutes of Health guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

2.2. Analysis of somatic growth, maturation of physical features and reflex ontogeny

The offspring of rats submitted to busulfan exposure during gestation were evaluated daily from P1 to P21. The pups of both groups, control and busulfan, were evaluated daily sometime between 08.00 and 10.00h with a digital caliper (Starrett, accuracy 0.01 mm) and a digital scale (Max, model S-1000, capacity 1 kg and sensitivity of 0.1 g). For the analysis of somatic growth, the distances (mm) from the anterior tip of the nasal bone to the posterior edge of the occipital bone (Anteroposterior axis of skull-APAS) and from the right to left of the temporal line of the parietal bone (Latero-lateral axis of skull-LLAS) were measured (Silva et al., 2005). Bodyweight was evaluated daily and encephalic weight was evaluated at 28 days of postnatal life.

For the analysis of the maturation of the physical features, the day when each physical feature was first observed was considered as the age of maturation. These features were eyes opening and exposure of the upper incisors and lower incisors (Smart and Dobbing, 1971).

Reflex ontogeny was evaluated as described by Fox (1965), Smart and Dobbing (1971) and Heyser (2004). Reflex responses were evaluated daily (between 08.00 and 10.00h) until maturation. The first of a series of three consecutive days in which the expected response appeared completely was considered the day of maturation of the reflex. The observed responses that indicated reflex maturation were: failure to perform rapid flexion of the fingers after two slight percussions in the forepaw palm (Palm grasp reflex); body rotation in dorsal decubitus for ventral decubitus within 10 s (Righting reflex); placement of forepaws on the table, trying to walk when suspended by the tail in up to 10 s (Vibrissae placing reflex); angular displacement of 45° of the animal in up to 10 s, when placed with forepaws on the margin of a flat and high surface (percipice) (Cliff avoidance reflex); the simultaneous and rapid retraction with involuntary immobilization after acute percussion on metallic object (Auditory Startle reflex); when held by all four paws in dorsal decubitus and let fall 30 cm, full turn the body landing on all four legs on a cotton bed (Free-fall fighting reflex); rotation within 10 s and positions the head upwards when placed in the center of a 45° incline ramp, positioned with the head downwards (Negative geotaxis reflex).

2.3. Morphometric analysis of the cerebral cortex

The animals were anesthetized with ketamine and xylazine (50 mg/kg, i.p.) and submitted to immediate transcardial perfusion with a phosphate-buffered saline followed by fixative solution (4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS, pH 7.4 at 4°C) at 28 days of postnatal life. After perfusion, the brains, including cerebellum, were removed from the skull and postfixed in the same fixative solution at 4°C overnight. They were then dehydrated in a cryoprotectant solution (30% sucrose in 0.1 M PBS), also at 4°C , for the time required to form a deposit at the bottom of the vessel. Brain coronal sections (20 μm) were obtained using a cryostat and every second section was collected (Marcuzzo et al., 2010). The sections were stained using the Nissl method and visualized using a digital camera adapted to an optical microscope (OLYMPUS model U-CMAD-2) and a digital image analysis system. Images were captured and digitalized in 4x for measurement of cortical and corpus callosum thickness and in $40\times$ for cell counting (neurons and glial cells) in layer V. For each rat, five coronal slices (both sides) of hind-limb S1 and M1 were used to measure thickness of cortical layers I–VI and corpus callosum, and for the neuron count in layer V (Marcuzzo et al., 2010). Three perpendicular measures throughout the six layers of S1 were taken every 0.3 mm starting at 2.4 mm (bregma

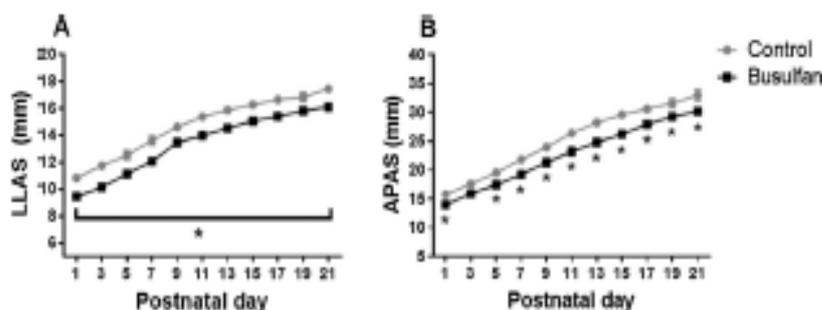


Fig. 1. Effects of busulfan on the development of the offspring skull during the lactation period. Growth of the latero-lateral axis of skull (LLAS) (A) and anteroposterior axis of skull (APAS) (B) in the lactation period. Data were expressed as mean \pm SEM. Control (n = 10); Busulfan (n = 10). Two-way ANOVA repeated measures and Bonferroni post-hoc test, *p < 0.05.

-0.48) and 2.2 mm (bregma -2.16) lateral from midline (adapted from Anderson et al., 2002). Three perpendicular measures throughout the six layers of M1 were taken every 0.3 mm starting at 2.4 mm (bregma 1.20) and 2.0 mm (bregma 2.28) lateral from the midline (adapted from Anderson et al., 2002). No attempt was made to correct for tissue shrinkage, which was expected to be equivalent across treatment conditions. In each corpus callosum, two measures were performed adjacent to midline (Marcuzzo et al., 2010). Morphometric studies were carried out by optical microscopy identified by stereotaxic coordinates in the primary somatosensory (SI, hind-limb representation, -2.28 to 0.36 mm of bregma) and motor (M1) cortices (M1: 0.00–4.20 mm of bregma) (Paxinos and Watson, 2007). In this range of bregma for SI, it is possible to observe several areas of the somatosensory cortex, such as hind-limb, forelimb, dysgranular zone, upper lip zone and others. In the motor cortex, it is possible to observe only the primary and secondary motor cortices (M1 and M2). Neurons and glial cells were counted per unit area (1365.84 μm^2) in 10 fields in each section (five in the left hemisphere and five in the right) (Marcuzzo et al., 2010). Neurons were identified by the presence of cresyl violet-stained cytoplasm and/or by their size (generally larger than glial cells and non-spherical) (Marcuzzo et al., 2010). Glial cells were distinguished from neurons based on their smaller size and spherical aspect (Salemone et al., 1999; Marcuzzo et al., 2010). In addition, we performed the measurement of the total area of a population of neurons in the counting frame area (1365.84 μm^2). The contour of each neuronal cytoplasm was traced manually on software (Image J - Freehand tool) to automatically calculate the area (μm^2) of each neuronal cell body (adapted from Takeda et al., 2014). All histochemical analysis was performed using computerized image analysis software from Image J (version 1.52a) software.

2.4. Data analysis

Each litter was considered as a sample unit and statistical analyses were performed using the mean values of each litter. The data were submitted to the normality test (Kolmogorov-Smirnov) and later the appropriate tests were used to evaluate significant differences. The somatic growth and morphometric analysis of the cerebral cortex were expressed as mean \pm standard error of the mean. The physical features and reflex-ontogeny were expressed as median (minimum-maximum). The two-way ANOVA repeated measures along with Bonferroni's post-hoc test were performed to assess significant differences in skull axes and body weight, with busulfan and olive oil as the independent variables and time as the repeated measure. The unpaired t-test was performed to evaluate significant differences in morphometric analysis of the cerebral cortex and somatic growth (body and encephalic weight at P28). The Mann-Whitney test was performed to assess significant differences in reflex-ontogeny and physical features. The level of significance was 5% (p < 0.05). The data were analyzed in GraphPadPrism 7.0 and SigmaStat 3.5. Principal components analysis (PCA) was performed on 2 sets of variables that indicate the development of the central nervous system (CNS), including: 1) reflexes and

physical features development composed of 10 variables (clip avoidance, vibrissae placing, negative geotaxis, free-fall righting, palmar grasp, righting, auditory startle, upper incisors eruption, lower incisors eruption and eyes opening); and 2) morphometric analysis of the cerebral cortex composed of 6 variables (SI and M1 neurons and glial cells, and SI and M1 area of a population of neurons). The PCA data was obtained using R (The R Foundation for Statistical Computing, Institute for Statistics and Mathematics, Wien, Austria).

3. Results

The pups of the busulfan group presented a significant reduction of the latero-lateral [$F(1,154) = 186.6$; p < 0.001] and anteroposterior skull axes [$F(1,154) = 102.2$; p < 0.001] compared to the control group. The reduction was significant in all evaluated ages in the latero-lateral axis (Bonferroni post hoc test: p < 0.001) and in the anteroposterior axis except in day 3 (Bonferroni post hoc test: p < 0.05) (Fig. 1A and B). We found no interaction between periods and groups for either the anteroposterior [$F(10,154) = 0.4$; p n.s.] nor the latero-lateral axes [$F(10,154) = 0.2$; p n.s.].

Body weight was statistically reduced in the busulfan group compared to the control group [$F(1,154) = 45.7$; p < 0.001]. The reduction of body weight was statistically reduced starting from day 9 (Bonferroni post hoc test: p < 0.05; Fig. 2). We found no interaction between periods and groups [$F(10,154) = 1.0$; p n.s.].

Using PCA to compute individual scores from the 10 variables of reflexes and physical features [$F(1,18) = 74.02$; < 0.001], the scores of the control group (-20.46 \pm 13.73) differed from the busulfan (20.82 \pm 6.44), suggesting a negative impact of busulfan administration on reflexes and physical features (Fig. 3). In addition, the principal components that contributed the most to variability in the data were the upper incisors eruption, fighting reflex and vibrissae placing reflex (Table 1).

To complement PCA data, we evaluate the parameters individually.

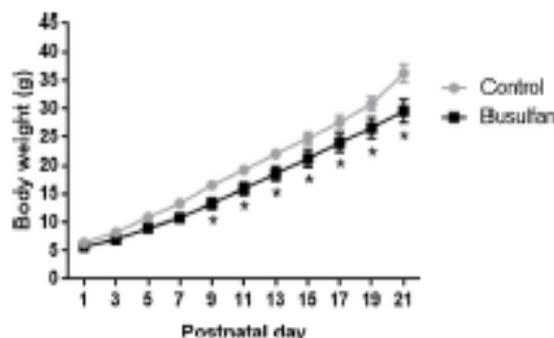


Fig. 2. Effects of busulfan on the body weight of the offspring during the lactation period. Data were expressed as mean \pm SEM. Control (n = 10); Busulfan (n = 10). Two-way ANOVA repeated measures and Bonferroni post-hoc test, *p < 0.05.

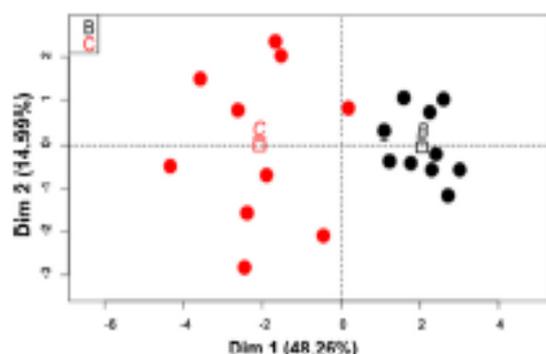


Fig. 3. Principal components analysis (PCA) of the development of reflexes and physical features of the offspring composed of 10 variables (clip avoidance, vibrissae placing, negative geotaxis, free-fall righting, palmar grasp, righting, auditory startle, upper incisors eruption, lower incisors eruption and eyes opening). C, Control (n = 10); B, Busulfan (n = 10).

Regarding the maturation of reflexes, the pups of the busulfan group presented delay in the disappearance of the palmar grip reflex when compared to the control group. Also, the busulfan group presented delay in the maturation of the reflexes of righting, vibrissae placing and free-fall righting when compared to the control group. Concerning the physical features, the pups of the busulfan group presented delayed eruption of the upper incisors and eyes opening when compared to the control group. Besides, busulfan group presented a reduction in absolute and relative encephalic weight at 28 days of postnatal life when compared to the control group (Table 1).

In PCA computed with 6 variables of somatosensory and motor cortex development [$F(1,10) = 9.18$; $p < 0.05$], the scores of control (14.07 ± 16.10) differed from busulfan (-10.28 ± 11.32), implying a negative effect of busulfan on morphometric parameters of the cerebral cortex (Fig. 4A). Also, the first two principal components that account for as much of the variability in the data as possible were the number of S1 neurons and neurons area in S1, suggesting that the somatosensory cortex was the most affected area by busulfan. To understand better the effect of busulfan, we analyzed specific morphometric parameters using the unpaired t test. Concerning the somatosensory cortex, there was a significant reduction in the number of S1 neurons in

the busulfan group when compared to the control group (control: 42.3 ± 2.6 vs busulfan: 36.0 ± 6.3 , $p < 0.05$) (Fig. 4B). Also, there was a significant reduction in S1 and M1 neurons area in the animals of the busulfan group when compared to the control group (S1; control: 369.02 ± 38.49 vs busulfan: 270.00 ± 37.16 , $p < 0.05$; M1; control: 405.57 ± 41.78 vs busulfan: 280.62 ± 31.46 , $p < 0.001$) (Fig. 4C and 4E). However, there was no difference between groups in the number of neurons of the M1 cortex, as well as in the number of glial cells in both the S1 and M1 cortex (Fig. 4B and 4D). Representative images of layer V of the hind-limb representation area in the somatosensory cortex and motor cortex of both experimental groups are presented below (Fig. 5). In addition, there was no significant difference in thickness alterations in the S1 cortex (bregmas -0.48 and -2.16), M1 cortex (bregmas 1.20 and 2.28), and corpus callosum (Table 2).

4. Discussion

In the present study, the effects of busulfan on young rats after exposure during pregnancy were assessed. As a result, busulfan-induced pathological changes included 1) microcephaly; 2) delay in reflex maturation and physical features; 3) reduction in absolute and relative encephalic weight; 4) decrease in the number and area of neurons in the somatosensory and in the neuron area of the motor cortex.

Firstly, we need to emphasize the reduction in anteroposterior and latero-lateral axes of the skull of the rat offspring exposed to busulfan during pregnancy. The reduction of these axes can be considered as similar to the reduction of the cranial circumference observed in humans, used for the diagnosis of microcephaly (WHO/CDC/ICD6R, 2014). In humans, the reduction of this circumference is an indication of brain malformations, such as reduction of brain mass, hypoplasia of cortical areas and corpus callosum, as well as disproportionalities between brain areas (Barkovich and Peacock, 1998; Furukawa et al., 2007; Huang et al., 2016b). As in humans, the reduction of cranial axes in rats after exposure to busulfan is an indication of brain hypoplasia (Furukawa et al., 2007). More specifically, the APAS axis represents the viscerocranium and the neurocranium, since its measurement is made from the anterior tip of the nasal bone to the posterior edge of the occipital bone (Miller and German, 1999). The reduction of this axis may indicate a reduction of the brain, mainly the cerebellum, or bones (nasal and jaw). The ILAS axis represents only the neurocranium because it is measured

Table 1
Effects of busulfan on reflex ontogeny, maturation of physical features and somatic growth of offspring.

Component	Group		Initial eigenvalue		
	Control	Busulfan	Total	% of variance	Cumulative %
Physical features and reflex-ontogeny					
Upper incisors eruption	8,5 (7,5-11)	11 (9,5-12)**	45,366	453,663	453,663
Righting	3,5 (2-4)	6 (4-7)***	1,64	164,002	724,126
Vibrissae placing	5,5 (4-8)	9 (7-11)**	10,646	106,461	617,605
Free-fall righting	14 (12,5-16)	1,6 (14-17,5)*	0,9017	90,175	814,301
Eyes opening	14 (13-15)	1,5 (14-17)*	0,7161	71,614	885,914
Negative geotaxis	15 (13-16)	1,6 (14,5-16)	0,483	48,303	934,217
Palmar grasp	5,5 (4-7)	7,5 (6-9)*	0,3247	32,472	966,689
Auditory startle	13,5 (11,5-15)	1,3 (12,5-14)	0,1553	15,526	982,215
Lower incisors eruption	7,5 (5-11)	9,5 (7-14)	0,1066	10,656	992,871
Clip avoidance	6,5 (4,5-9)	6 (5-6)	0,0713	0,7129	100
Somatic growth					
Body weight at 28 days (g)	62,4 \pm 2,42	64,0 \pm 3,07			
Encephalic weight at 28 days (mg)	1394,0 \pm 44,25	1063,0 \pm 40,74***			
Relative encephalic weight at 28 days (mg/g)	22,45 \pm 0,62	1,678 \pm 0,05***			

Values represent median (minimum-maximum) for reflex-ontogeny and physical features and mean \pm SEM for somatic growth. Control (n = 10); Busulfan (n = 10). Mann-Whitney test for reflex-ontogeny and physical features. Unpaired t test for somatic growth.

* $p < 0.05$.

** $p < 0.001$.

*** $p < 0.0001$.

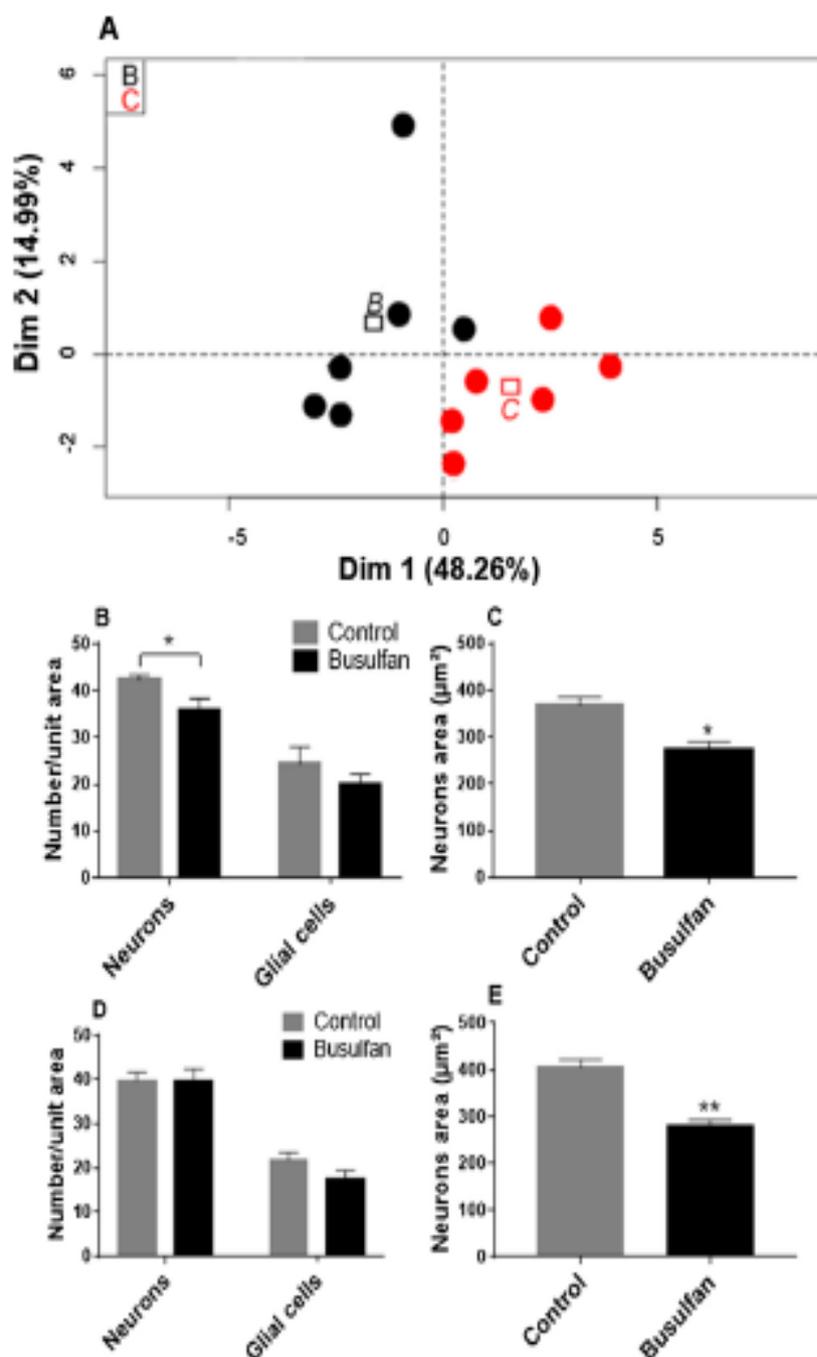


Fig. 4. Effects of busulfan on morphometric parameters of the cerebral cortex. A. PCA analysis of the morphometric analysis of the cerebral cortex composed by 6 variables (SI and MI neurons and glial cells, and SI and MI area of a population of neurons). B. SI number of neurons and glial cells per unit area. C. SI neurons area. D. MI number of neurons and glial cells per unit area. E. MI neurons area. Values represent mean \pm SEM. Control (n = 6); Busulfan (n = 6). Unpaired t test. *p < 0.05, **p < 0.001.

from the right to left of the temporal line of the parietal bone (Miller and German, 1999). Thus, the reduction of LLAS throughout the lactation period is a good indicator of brain size. As previously reported in the literature, there was reduction in body weight due to damage in hematopoietic and lymphoid organs (Ohira et al., 2013a; Mitomi et al., 2014) in mt pups that had received busulfan during lactation. Similarly, the results in our study showed a body weight reduction starting from day 9. However, the difference between the studies mentioned and our

study is that, in our study, the busulfan was administered during pregnancy and the effects were observed in the offspring during lactation. In addition, there was a reduction in relative encephalic weight after weaning, on day 28, in the animals of the busulfan group, which agrees with another study that reported a direct effect of busulfan on the brain, regardless of body weight (Ohira et al., 2013a).

The reflex-ontogeny is considered an indicator of the development and maturation of the brain because it involves a simultaneous

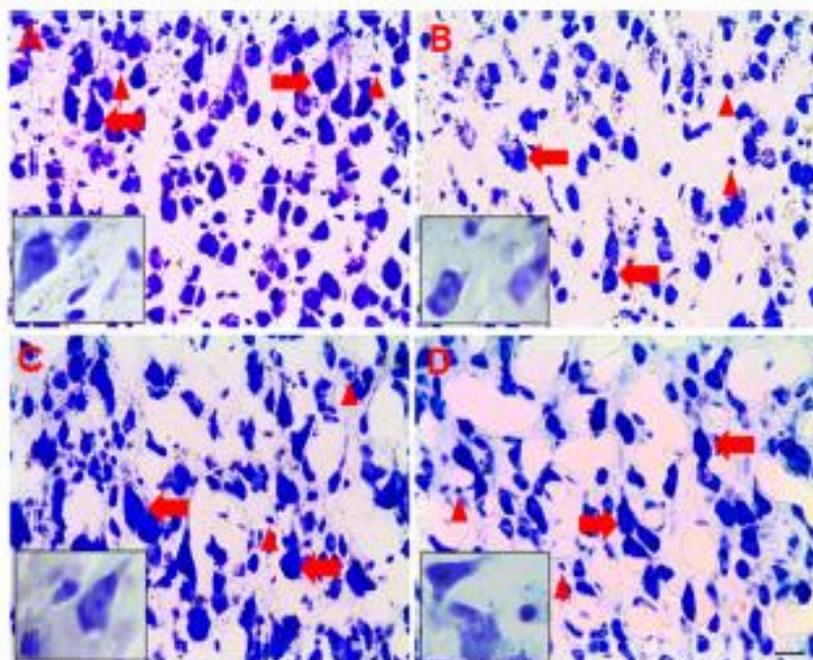


Fig. 5. Representative images of Nissl-stained sections showing the layer V of the hind-limb representation in the primary somatosensory cortex of control (A) and busulfan (B) and representation of primary motor cortex of control (C) and busulfan (D). Neurons (complete arrows) were identified mainly by their generally larger shape and morphological outline. Glial cells (arrowheads) were identified by their generally smaller size and spherical outline. The busulfan group showed a reduction in neuron numbers and neuronal mass area in somatosensory cortex. In motor cortex, there was a decrease only in mass areas of neurons in busulfan group. Larger microphotography = 40 \times . Smaller microphotography = 100 \times . Scale bar = 100 μ m. (Cresyl violet staining).

Table 2
Effects of busulfan on thickness measurements in somatosensory and motor cortex and corpus callosum.

Thickness	Control	Busulfan	p Value
Corpus callosum	301,18 \pm 26,74	292,67 \pm 18,00	0,797
S1 cortex (-0.40)	1696,09 \pm 22,76	1649,33 \pm 17,21	0,134
S1 cortex (-2.16)	1299,73 \pm 26,86	1285,60 \pm 20,29	0,917
M1 cortex (1.20)	1660,89 \pm 17,29	1600,81 \pm 22,03	0,051
M1 cortex (2.20)	1598,57 \pm 13,44	1563,93 \pm 11,02	0,066

Values represent mean \pm SEM. Control (n = 6); Busulfan (n = 6). Unpaired t test, *p < 0.05.

sequence of events and participation of various regions of the CNS (Fox, 1965; Smart and Dobbing, 1971). The offspring exposed to busulfan during pregnancy presented delay in the disappearance of the palmar grasp reflex and in the maturation of the reflexes of righting, vibrissae placing and free-fall righting after birth. The palmar grasp reflex is classified as innate and disappears as the CNS matures, so the delay in its disappearance may suggest underdevelopment or CNS damage (Adlan and Dobbing, 1973). Other reflexes such as free-fall fighting and righting are acquired as the CNS matures and require coordination of members and balance (Cassidy et al., 1994). Both the cerebellum and spinal cord are involved in the activity of these reflexes (Cassidy et al., 1994). Baskovich and Peacock (1998) reported that the incidence of individuals with a small cerebellum is high in microcephaly. Hence, the delay in the onset of free-fall righting and righting reflexes suggests that microcephalic animals may present a small cerebellum as observed in humans. In rats, Ohira et al. (2013a) published the first report of the presence of apparent hypoplasia in the cerebellum of animals submitted to busulfan in the lactation period due to increased apoptotic and reduced mitotic granular cells. The vibrissae placing reflex is also acquired as the CNS matures. A delay in this reflex may indicate poor somatosensory cortical stimulation because the vibrissae are considered a sensory organ (Michison et al., 2011). The results therefore suggest that other areas not evaluated in this study, such as the cerebellum, were possibly affected by exposure to busulfan during pregnancy.

Regarding physical features, a delay in eruption of the upper

incisors and eyes opening was observed in the offspring exposed to busulfan during pregnancy. The first parameter depends on a sequence of events, which includes the movement of the alveolar bone, found in the alveolar arch, into the oral cavity (Wise and Mag, 2008), suggesting that the development of the mandible can directly influence the eruption of the incisors. Impairments in the mandible are common in individuals who have abnormalities in the skull (Huang et al., 2016a). In microcephaly, cranial alterations also affect the mandible, reflecting malformations such as dysostosis (Huang et al., 2016a) and reduction of mandibular opening (Leal et al., 2017). Climen et al. (1992), suggesting a close relationship between mandibular development and eruption of teeth with abnormalities in the skull, such as microcephaly (Climera et al., 1992). Furthermore, Ohira et al. (2009) found pyknosis in craniofacial and eye tissue of rat fetuses after exposure to busulfan on gestational day 13. Similarly, Saito et al. (2015) reported that after exposure to busulfan in the lactation period, the pups presented ocular lesions. These results suggest a negative effect of busulfan on the whole skull, including the eyes.

In the primary somatosensory cortex of offspring exposed to busulfan during pregnancy, there was a reduction in the number and area of S1 neurons corresponding to hind limbs. Alterations in movement patterns are responsible for causing changes in this area (Coq et al., 2008). Moreover, there was a reduction in the area of M1 neurons of the offspring exposed to busulfan during pregnancy. However, the number of M1 neurons and the number of glial cells S1 and M1 did not differ between the groups evaluated. Several studies have demonstrated the effect of busulfan on CNS development (Furukawa et al., 2007; Ohira et al., 2013a, b). A study reported that busulfan has a long-term effect (> 96h) on the brain, spinal cord and eyes of fetuses after administration during pregnancy, but not on other tissues like kidneys, pancreas, and liver (Ohira et al., 2009). After administration on gestational day 13, Ohira et al. (2013b) reported that busulfan induced apoptosis and also inhibited cell proliferation in neural progenitor cells. The authors, however, only evaluated effects on fetuses. Although several studies have demonstrated the effects of busulfan on the brain, we are, however, the first to report changes in cortical morphometry in the postnatal period after exposure to busulfan in the prenatal period. Despite the reduction in cranial axis, there was no difference between

thickness measurements in different somatosensory and motor cortex bregmas and the corpus callosum, as shown in Table 2. This can be explained by the fact that the measurements performed (ILAS and APAS) do not necessarily indicate a reduction in somatosensory and motor cortical volume, as shown in Table 2 in the manuscript. Volume reduction may have mainly affected the cerebellum or other parts of the brain, or even the bones (nasal and jaw), as previously mentioned. There was, however, a tendency toward a reduction of the M1 cortex in the busulfan group, but, as seen, there was no difference in cell numbers in this area. Therefore, the reduction in cell number in the S1 cortex was not dependent on the volume reduction.

The data obtained in our study give new insights into the potential teratogenic and cytotoxic effects of busulfan on the development of animals exposed to this DNA alkylating during pregnancy. Reports of studies with humans have found no deleterious effects of busulfan on the physical development and hematologic parameters of children following intrauterine exposure (Dennis and Stein, 1965; White, 1962). Data was not found from randomized clinical trials on the exposure of this drug to the development of the central nervous system. Thus, our data suggest that it is important to evaluate the effects of busulfan exposure during pregnancy on offspring after birth. In addition, an understanding of the morphological changes in the cortex of infant rats may contribute to progress in the field of developmental toxicology.

This work has some limitations. Firstly, we did not evaluate the mechanisms related to the reduction of neurons found in our study. Other studies have reported that busulfan causes apoptosis via the p53-dependent intrinsic mitochondrial pathway both *in vivo* and *in vitro* (Ohira et al., 2013b; Valdez et al., 2010). The p53 is a tumor suppressor protein that regulates various cellular processes, such as senescence and death, in response to different forms of stress (Laptenko and Paves, 2006). Secondly, we did not evaluate doses above 10 mg/kg to obtain dose-response results. However, as seen, Furukawa et al. (2007) reported that this dose was enough to cause hypoplasia in the brain, retina, and lens. Besides, even at doses less than 10 mg/kg, Mitomi et al. (2014) have reported abnormal molar root development in pups after exposure to busulfan in the postnatal period. Lastly, litter size may have influenced somatic growth, as shown by Chaloud and Paumgarten (2009). This factor, however, was probably minimal in our study because the litters where somatic growth was evaluated were formed by 8–10 animals. In addition, as reported by Tanaka (2004), neurobehavioral development is not influenced by litter size or offspring weight.

In conclusion, this study showed that the exposure to busulfan during pregnancy negatively influenced the cranial axes, the maturation of reflexes, somatic growth and physical features on rat pups in the lactation period. There was also a reduction of morphometric parameters of neurons in the primary somatosensory and the motor cortices. These findings confirm that busulfan has a potential teratogenic and cytotoxic effect on the brain even if not administered directly to pups.

Declaration of competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, No 1734-2015) and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, BPG-1326-4.05/16) for the financial support.

References

Adlard, B.P., Dobbing, J., 1971. Vulnerability of developing brain. 3. Development of four enzymes in the brains of normal and undernourished rats. *Brain Res.* 28 (1), 97–107.

Anderson, B.J., Eckburg, P.R., Rakic, P., 2002. Alterations in the thickness of motor cortical subregions after motor-skill learning and exercise. *Learn. Mem.* 9 (1), 1–9.

Ashwal, S., Michelson, D., Flewett, L., Dobyns, W., 2009. Fraction parameter: evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review): report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society. *Neurology* 73 (11), 887–897.

Badcock, A.J., Pearson, W., 1998. Sublobar dysplasia: a new malformation of cortical development. *Neurology* 50 (5), 1303–1307.

Bishop, J.B., Watson, J.S., 1986. Toxicological review of busulfan (Myelotan). *Mutat. Res.* 168 (July (1)), 15–45.

Clemen, G., Bontas, S., Zuchinetti, F., Fomolo, S., Giunta, E., 1992. Single maxillary central incisor and holoprosomelia. *Pathologica* 84 (10/91), 425–428.

Casidy, G., Bradshaw, D., Pfeiffer, J.F., Chazana, T., 1994. The development of neuro-motor reflexes in the Brazilian opossum *Mondolphis domestica*. *Brain Behav. Evol.* 43 (4–5), 244–253.

Chaloud, I., Paumgarten, F.J.R., 2009. Influence of litter size on the postnatal growth of rat pups: is there a rationale for litter-size standardization in toxicity studies? *Environ. Res.* 109 (8), 1021–1027.

Coq, J.O., Szeles, F., Ruster, M., Sahel, F.F., Merssich, M.M., Byl, N.N., Barba, M.F., 2008. Impact of neonatal aphixia and hind limb immobilization on macrofascial fibers and S1 map organization: implications for cerebral palsy. *Exp. Neurol.* 210 (1), 95–108.

Dennis, L.H., Stein, S., 1965. Busulfan in pregnancy: report of a case. *JAMA* 24 (192), 715–716.

Fox, W.M., 1965. Reflex-ontology and behavioural development of the mouse. *Anim. Behav.* 13 (2), 234–241.

Furukawa, S., Usada, K., Abe, M., Ogawa, I., 2007. Microcephaly and microphthalmia in rat fetuses by busulfan. *Histol. Histopathol.* 22 (4), 389–397.

Hayes, C.J., 2004. Assessment of developmental milestones in rodents. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 8, p. Unit 8.18.

Huang, L., et al., 2016a. Mandibulofacial dysostosis with microcephaly mutation and database update. *Hum. Mutat.* 37 (2), 149–154.

Huang, W.C., Abraham, R., Shih, B.S., Chou, H., Page, D.T., 2016b. Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. *Sci. Rep.* 6, 34793.

Iwanaga, T., Hirata, Y., Okawa, S., Mizuno, H., Kojima, M., Kawachi, S., 2004. DNA in a rat and cross-link at the 5'-GA-3' sequence formed by busulfan and its role in the cytotoxic effect. *Cancer Sci.* 95 (5), 454–458.

Laptenko, O., Paves, C., 2006. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death Differ.* 13 (6), 951–961.

Leal, M.C., Van der Linden, V., Bezerra, T.P., Valois, L., Borges, A.C.G., Antunes, M.M.C., Brandt, K.G., Moura, C.X., et al., 2017. Characterization of dysphagia in infants with microcephaly caused by congenital Zika virus infection. *Brazil*, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 23 (8), 1253–1259.

Marrero, S., Dutra, M.F., Stigger, F., do Nascimento, P.S., Iha, J., Noll-Gasper, P.I., Adhary, M., 2010. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell number in the somatosensory cortex in rats. *Brain Dev.* 32 (4), 323–331.

Marin, K., Matias, C., Takeda, H., Pereira, A.D., Azevedo, A., 2008. Successful pregnancy following busulfan and cyclophosphamide conditioning and allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 14, 944–945.

Miller, J.P., German, R.Z., 1999. Protein malnutrition affects the growth trajectories of the craniofacial skeleton in rats. *J. Nutr.* 129 (11), 2061–2069.

Mishra, R., Grant, R.A., Arley, K., Rankov, V., Paton, I., Pearson, T.J., 2011. Active viral-like nesting in rodents and marmoset. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 366 (1581), 3037–3048.

Mitomi, T., Sawano, Y., Kinoshita-Sawano, S., 2014. Effect of the antineoplastic agent busulfan on rat molar root development. *Arch. Oral Biol.* 59 (1), 47–59.

Narita, T., Takahara, M., Takagi, M., Ohno, K.C., Ogino, T., 2007. Busulfan-induced central polydactyly, syndactyly and cleft hand or foot: a common mechanism of disruption leads to divergent phenotypes. *Dev. Growth Differ.* 49 (6), 533–541.

Ohira, T., Ando, R., Andoh, R., Nakazawa, T., Nishihara, K., Yamamoto, S., Nakamura, N., Tamura, K., 2009. Distribution and apoptosis of pyknotic cells in rat fetuses exposed to busulfan. *J. Toxicol. Pathol.* 22 (3), 167–171.

Ohira, T., Ando, R., Saito, T., Yabara, M., Ohira, Y., Tamura, K., 2013a. Busulfan-induced pathological changes of the cerebellar development in infant rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 65 (6), 789–797.

Ohira, T., Ohira, Y., Ando, R., Okada, Y., Suzuki, H., Saito, T., Nakazawa, T., Nishihara, K., Yamamoto, S., et al., 2013b. Sequence of busulfan-induced neural progenitor cell damage in the fetal rat brain. *Exp. Toxicol. Pathol.* 65 (5), 523–530.

Ohira, T., Saito, T., Ando, R., Tamura, K., Hoshiya, T., 2014. Systemic histopathology of in utero rats exposed to busulfan. *J. Toxicol. Pathol.* 27, 25–29.

Otaf, M., Takahara, M., Narita, T., Guan, D., Harata, M., Zhu, P., Takagi, M., Ogino, T., 2005. Developmental abnormalities in rat embryos leading to thalidomide deficiency in caused by busulfan. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Toxicol.* 73 (6), 461–467.

Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*. Academic Press.

Pruis, M.L., Hard, D.A., 2003. Developing experimental models to address traumatic brain injury in children. *J. Neurotrauma* 20 (2), 123–137.

Ruedler, E., Ruedler, A., Feldman, S., 1980. Dynamical aspects of neonatal histogenesis in the rat. *Anat. Embryol.* 158 (3), 253–269.

Rios, D., Barone, J., 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 108 (3), 511–523.

Saito, T., Ando, R., Ohira, Y., Hoshiya, T., Tamura, K., 2015. Ocular lesions induced in in utero rats by busulfan. *Histol. Histopathol.* 30 (3), 321–330.

Selmon, L.D., Lidow, M.S., Goldman-Rakic, P.S., 1999. Increased neurons and glial

- density in primate prefrontal cortex obtained with chronic antipsychotic drug exposure. *Biol. Psychiatry* 46 (2), 161–172.
- Silva, H.J., Martins, S.M.O., Silva, A.E.T.M., Albuquerque, C.G., Moraes, S.R.A., Marinho da Costa, B., 2005. Protocol of non-invasive to evaluation of indicators of osseous development of white rat. *Int. J. Morphol.* 23 (2), 227–230.
- Smart, J.L., Dobbing, J., 1971. Vulnerability of developing brain. I. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res.* 28 (1), 85–95.
- Takeda, T., Uchihara, T., Nakayama, Y., Nakamura, A., Suzuki, S., Kikui, S., Uchiyama, S., Doykosetsu, C., Yoshida, M., 2014. Dendritic retraction, but not atrophy, is consistent in amyotrophic lateral sclerosis-like-compares between C9orf72 neurons and other neural motor neurons. *Acta Neuropathol. Commun.* 2 (11).
- Tuindika, P.J., Copelan, E.A., Klein, J.S., 1987. Bone marrow transplantation for acute leukemia following a new busulfan and cyclophosphamide regimen. *Blood* 70 (5), 1382–1388.
- Valde, L.C., Li, Y., Murray, D., Corn, P., Champin, R.E., Anderson, B.S., 2010. 5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes busulfan-resistant MyeloidLeukemia cells by regulating expression of genes involved in cell cycle checkpoint and apoptosis. *Leuk. Res.* 34 (3), 364–372.
- White, L.G., 1962. Busulfan in pregnancy. *JAMA* 179 (12), 973–974.
- WHO/CDC/UNICEF, 2014. *Birth Defect Surveillance: A Manual for Programme Managers*. World Health Organization, Geneva. Downloaded from: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/110222/9789241548734_eng.pdf;jsessionid=3E106E78C471A6A8E6C275A1F4FC9A01?sequence=1>.
- Wise, G.E., King, G.J., 2008. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J. Dent. Res.* 87 (5), 414–424.

ANEXO – A PARECER N° 0006/2018 CEUA

Recife, 06 de novembro de 2018

Ofício nº 98/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**
 Departamento de Nutrição
 Centro de Ciências da Saúde
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº 0006/2018

Certificamos que a proposta intitulada **“Modelo Experimental de Microcefalia: Desenvolvimento Murinométrico e Neuromotor em Ratos Submetidos ou não ao Polifenol (Kaempferol) no Período Neonatal.”** registrada com o nº0006/2018, sob a responsabilidade de Prof. **Raul Manhães de Castro** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/10/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	2 anos
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogenico
Nº de animais	165
Peso/Idade	210-250g/ 90 a 120 dias
Sexo	(135) Macho e (30) Fêmea
Origem	Bioterio de criação do Departamento de Nutrição (UFPE).

Atenciosamente,



Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345891

