

IMPLICAÇÕES DO TRATAMENTO NEONATAL COM FLUOXETINA SOBRE A HISTOMORFOMETRIA DO CÓRTEX SOMATOSSENSORIAL DE RATOS SUBMETIDOS A MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL

Sabrina da Conceição Pereira (1); Luana de Moura Monteiro (1); Bárbara Juacy Rodrigues Costa de Santana (2); Henrique José Cavalcanti Bezerra Golveia (3); Ana Elisa Toscano (1)

(1) Programa de Pós Graduação em Fisioterapia – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

ft.sabrinapereira@gmail.com luana8188@hotmail.com aetoscano@hotmail.com

(2) Programa de Pós Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE. barbara.jrcs@gmail.com

(3) Programa de Pós Graduação em Nutrição – Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE.

henriquegouveia.93@hotmail.com

Resumo: A Paralisia Cerebral (PC) está entre as maiores categorias de deficiências do desenvolvimento neuromotor e nenhum dos tratamentos atuais é capaz de reverter as lesões cerebrais primárias. Nosso objetivo foi avaliar os efeitos da manipulação serotoninérgica neonatal na histomorfometria do córtex somatossensorial (S1) em ratos submetidos à PC experimental. Foram utilizados ratos machos albinos Wistar distribuídos em quatro grupos de acordo com a PC experimental (anóxia perinatal+restrição sensório-motora) e manipulação farmacológica (via subcutânea durante o período de lactação - 2º ao 21º dia de vida): Controle Salina (CS, n=5/NaCl 0.9%, 10ml/Kg); Controle Fluoxetina (CF, n=5/F 10mg/Kg), PC Salina (PCS, n=5) e Grupo PC Fluoxetina (PCF, n=4). Ao 29º dia de vida os animais foram perfundidos transcardialmente com paraformaldeído 4% para coleta do encéfalo. Foram contadas as células gliais e neurônios piramidais na camada V e mensurada a espessura do córtex S1 através do software ImageJ. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais-UFPE (CEUA:0005/2015). Os resultados foram expressos em média e EPM, utilizado teste Anova Two Way e pós-teste de Bonferroni, considerando nível de significância de 5%. Houve diminuição de neurônios, aumento de células gliais e do índice glia/neurônio nos grupos PCS e CF em comparação com o grupo CS ($p < 0,001$). A espessura do córtex S1 foi aumentada no grupo PCF em relação ao PCS ($p = 0,036$). Concluímos que a exposição à PC experimental provocou danos histomorfométricos no córtex S1, sendo que a manipulação serotoninérgica neonatal não atenuou danos histológicos, mas aumentou a espessura do córtex S1.

Palavras-chave: Paralisia cerebral, córtex somatossensorial, fluoxetina, serotonina, plasticidade neuronal.

Introdução

A Paralisia Cerebral (PC) é descrita como um grupo de síndromes clínicas que resultam em distúrbios permanentes de movimento e postura, atribuídas a distúrbios não progressivos que ocorreram no cérebro fetal ou infantil em desenvolvimento (DODGE, 2008; STAVSKY et al., 2017). A incidência mundial é estimada em 2-3 por 1000 nascidos vivos (OSKOUİ et al., 2013; PATEL et al., 2010; STAVSKY et al., 2017), incluindo-se como fatores de risco a restrição do crescimento fetal, infecção durante o período fetal e neonatal, asfixia ao nascimento, extremo baixo peso ao nascer (OSKOUİ et al., 2013), hemorragia intracraniana e trauma (KRIGGER, 2006).

Este distúrbio neurológico está entre as maiores categorias de deficiências do desenvolvimento neuromotor (PATEL et al., 2010) em que as crianças caracterizam-se por atraso na aquisição de habilidades motoras (MOCKFORD; CAULTON, 2010) e por distúrbios do processamento sensorial (PAVÃO; ROCHA, 2017) e de percepção (QIU; YANG; LI, 2017). Dependendo do grau e da área afetada irá refletir diretamente as incapacidades resultantes, sendo algumas áreas cerebrais mais susceptíveis que outras (JONES et al., 2007; KESAR et al., 2012).

A fim de reproduzir os danos neurofuncionais e esclarecer os mecanismos subjacentes à esta patologia, modelos experimentais de PC tornaram-se ferramentas que reproduzem essa patologia em animais (LACERDA et al., 2017a). Ocasionalmente ocorrem alterações semelhantes às ocorridas em crianças com PC (COQ et al., 2008; LACERDA et al., 2017b; MARCUZZO et al., 2010; SILVA et al., 2016; STRATA et al., 2004), evidenciando a importância de estudos experimentais que avaliam a vulnerabilidade do cérebro em desenvolvimento.

Dessa forma, a janela crítica de desenvolvimento é definida pelo período perinatal (JENSEN, 2002). No cérebro, este período caracteriza-se pela variação dinâmica na estrutura e função neuronal e glial que pode ser determinante quanto à lesão de substância branca e cinzenta (JENSEN, 2002; JIANG; NARDELLI, 2016). Reflete a fase de maior plasticidade uma vez que as redes neurais são mais sensíveis às influências ambientais (ANDERSON; SPENCER-SMITH; WOOD, 2011), variando no padrão de desenvolvimento ou fenótipo (ROCHA-FERREIRA; HRISTOVA, 2016).

O insulto precoce da PC experimental promove, dentre outras alterações neurológicas, a perda de neurônios serotoninérgicos (REINEBRANT; WIXEY; BULLER, 2013), diminuição das fibras serotoninérgicas no córtex somatossensorial associado à interrupção do desenvolvimento talamocortical regulado por serotonina (KANNAN et al., 2010). Portanto, a manipulação do sistema serotoninérgico tem sido alvo de estudos no campo da neuroplasticidade na tentativa de compreender seus efeitos sobre o sistema nervoso, em que a serotonina é um neurotransmissor relevante para o desenvolvimento cerebral (WHITAKER-AZMITIA, 2010).

A manipulação do sistema serotoninérgico com inibidor seletivo da recaptação de serotonina (ISRS) ocorre via bloqueio do transportador de serotonina pré-sináptica e resulta em um aumento transitório na serotonina sináptica (GLOVER; CLINTON, 2016). Sendo assim, capaz de promover alterações duradouras na função celular, como transmissão serotoninérgica, neurogênese e epigenética, sendo estes os prováveis benefícios terapêuticos dos ISRS (GLOVER; CLINTON, 2016). Neste contexto, o tratamento com ISRS também tem sido investigado no tratamento da doença de Parkinson e Alzheimer, o que justificaria tais efeitos em outras patologias neurológicas, como a PC, devido ao indicativo papel da serotonina na neurogênese (FIDALGO; IVANOV; WOOD, 2013).

Apesar das conhecidas repercussões clínicas da PC, os tratamentos disponíveis, atualmente, são de enfoque na limitação da funcionalidade da criança e no atraso na aquisição de habilidades motoras. Estudos investigando tratamentos para as lesões cerebrais primárias são escassos, sendo que uma intervenção ainda no período crítico de desenvolvimento poderia reverter ou reduzir os danos neurológicos. Portanto o objetivo do presente estudo é avaliar os efeitos histomorfométricos no córtex somatossensorial (S1) da manipulação neonatal do sistema serotoninérgico em ratos submetidos à PC experimental. E assim, contribuir para o esclarecimento da manipulação do sistema serotoninérgico sobre a plasticidade cerebral, além de agregar novas perspectivas de estratégias de tratamento na PC.

Metodologia

Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizados ratos machos *Albinus Wistar*, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, mantidos em biotério com temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ em ciclo invertido e alojados em gaiolas com livre acesso à água e alimentação (dieta Labina – Purina

S/A). Logo após o nascimento os neonatos foram aleatorizados para compor ninhadas de oito filhotes, divididos em quatro grupos experimentais de acordo com a indução da PC experimental e manipulação farmacológica: Controle Salina (CS, n=5), filhotes submetidos à administração de salina (NaCl 0.9%, 10 ml/Kg); Controle Fluoxetina (CF, n=5), filhotes submetidos à administração de fluoxetina (10 mg/Kg); PC Salina (PC S, n=5), filhotes submetidos ao modelo de PC e à administração de salina; PC Fluoxetina (PC F, n=4), filhotes submetidos ao modelo de PC e à administração de Fluoxetina. Os animais foram amamentados durante os primeiros 21 dias de vida, e entre o 22° até 28° dia de vida, foram mantidos em gaiolas com 3 a 4 animais advindos da mesma ninhada, separados de acordo com o grupo experimental. No 29° dia de vida foi realizada a eutanásia através da técnica de perfusão transcardíaca de substâncias fixadoras, seguida da dissecação do encéfalo para análise histomorfométrica.

O manejo e os cuidados com os animais seguiram as normas recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e as normas internacionais do *National Research Council of the National Academies* (EUA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (CEUA/CCB-UFPE), processo nº0005/2015.

Paralisia Cerebral Experimental

O modelo experimental de paralisia cerebral foi baseado nos experimentos que associam a anóxia perinatal a um modelo de restrição sensório-motora das patas posteriores (COQ et al., 2008; LACERDA et al., 2017b; MARCUZZO et al., 2010; SILVA et al., 2016; STRATA et al., 2004). Os filhotes dos grupos PC foram submetidos anóxia pós-natal, no dia do nascimento e no primeiro dia de vida (P0 e P1). Os filhotes foram colocados dentro de uma câmara de vidro parcialmente imersa em água a 37 graus e expostos a nitrogênio (100%) a 9L/min por 12 minutos, em seguida, ressuscitados em temperatura ambiente e devolvidos as suas respectivas mães. Do 2° ao 28° dia de vida (P2 ao P28) foi feita a restrição sensório-motora das patas posteriores durante 16 horas por dia, sendo permitida nas 8 horas restantes, a livre movimentação do animal. Para a restrição sensório-motora foi utilizada uma órtese feita com molde de epóxi de forma que permitisse apenas movimentos limitados da articulação do quadril, deixando os membros posteriores estendidos, sem que a eliminação de urina e fezes e os cuidados maternos fossem prejudicados (STRATA et al., 2004).

Manipulação Farmacológica

Um ISRS, a fluoxetina, foi administrado durante o período de lactação (2° ao 21° dia de vida), com o objetivo de manipular o sistema serotoninérgico. O fármaco foi obtido na forma de cloridrato de fluoxetina numa concentração da droga de 10 mg/Kg de peso corporal (p.c.) do animal. No grupo controle foi utilizada uma concentração de solução de Salina (NaCl) à 0,9% de 10ml/kg p.c. O tratamento foi administrado por via subcutânea no dorso do animal uma hora após o início do ciclo escuro, horário que coincide com o pico de liberação de 5-HT no hipotálamo e potencializa a ação do fármaco (MATEOS et al., 2009).

Coleta dos Encéfalos e Histomorfometria

No 29° dia de vida, os animais foram anestesiados e perfundidos transcardialmente com salina tamponada em tampão fosfato, seguida de solução paraformaldeído (PFA) 4% à 0.2M (COQ et al., 2008; MARCUZZO et al., 2010). Foi realizada a craniotomia e o encéfalo dissecado para pós-fixação e processamentos histológicos posteriores (COQ et al., 2008). Secções coronais do encéfalo (20 µm; Coordenada estereotáxica: bregma -2,30 à -3,30mm) (PAXINOS; WATSON, 2006) foram feitas em criostato à - 25°C, sendo os cortes coletados em lamínas e corados com hematoxilina-eosina (HE).

A camada V do córtex somatossensorial (S1) foi analisada, capturando-se imagens em varredura através de microscópio óptico (OLYMPUS® modelo U-CMAD-2, objetiva 40x) utilizando o software *Analysis Get It*. Para cada animal, foram utilizados 5 cortes, sendo em cada corte capturadas 10 imagens (5 do hemisfério direito e 5 do esquerdo). As imagens foram analisadas através do software *ImageJ* para contagem do número de células gliais e de neurônios, sendo a célula glial caracterizada pela ausência de citoplasma e coradas em aspecto esférico, e os neurônios, caracterizados pela visualização do citoplasma e o seu tamanho geralmente maior e de contorno não esférico (KONOPASKE et al., 2007; MARCUZZO et al., 2010). Adicionalmente, foi realizado o índice glia-neurônio, calculado como a proporção de células da glia por neurônios por unidade de área (15µm²) (MARCUIZZO et al., 2010). Para a análise da espessura do córtex S1 também foram capturadas imagens em microscópio óptico (ZEISS® Axio Imager.M2, objetiva 5x) utilizando o software *AxioVision Rel. 4.8* para posterior análise no software *ImageJ*. A espessura do córtex S1 foi delimitada como o comprimento entre a margem externa da camada molecular (Camada I) e a margem interna da camada fusiforme (Camada 6b).

Análise Estatística

Os dados foram analisados através do software *SigmaStat 3.5*, em que foi realizado o teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. Para comparação entre as variáveis histomorfométricas foi utilizado o teste paramétrico *Anova Two Way* seguida do pós teste de *Bonferroni*. Os resultados foram expressos como média e erro padrão de média, sendo o nível de significância estatística definida como $p < 0,05$ em todos os casos.

Resultados e Discussão

Avaliamos no presente estudo as repercussões histomorfométricas no córtex S1 da PC experimental em ratos, e os possíveis efeitos da manipulação neonatal do sistema serotoninérgico sobre os danos corticais decorrentes da exposição ao modelo de PC. Dessa forma, foram analisados o número de neurônios piramidais e células gliais na camada V do córtex S1 e a espessura desta região (Figura 1).

Houve a redução do número de neurônios (PCS: $17,632 \pm 0,715$ / CS: $26,292 \pm 0,715$ $p < 0,001$) e o aumento de células gliais (PCS: $39,260 \pm 1,253$ / CS: $23,796 \pm 1,253$ $p < 0,001$) nos animais submetidos à PC experimental comparado ao grupo controle. E consequentemente, houve aumento do índice glia/neurônio (PCS: $2,300 \pm 0,151$ / CS: $0,880 \pm 0,151$ $p < 0,001$) (Figura 2). Estes resultados corroboram com estudos que também utilizaram modelos de PC (COQ et al., 2016; MARCUZZO et al., 2010; ROBINSON et al., 2005) e podem ser elucidados compreendendo-se o mecanismo de lesão cerebral perinatal.

Pode haver uma susceptibilidade aumentada à morte celular programada em diferentes regiões do cérebro em desenvolvimento, abrangendo inclusive os neurônios corticais imaturos (TITOMANLIO et al., 2016). Após o evento lesional, as células microgliais, que são o principal tipo de célula de imunovigilância no cérebro, podem exercer efeitos duplos, como ativação de mecanismos de morte celular e degradação de componentes da barreira hematoencefálica, mas também atuar no reparo neural, provavelmente atuando como um componente "tampão" na resposta inflamatória do cérebro (TITOMANLIO et al., 2016). Dessa forma, a própria PC pode desencadear uma cascata lesional, provavelmente, reduzindo a proliferação e aumentando a morte celular neuronal, assim como, ativando as células gliais de forma compensatória em resposta à lesão.

Ademais, foi observado que a administração de fluoxetina exerceu efeito semelhante à injúria cerebral decorrente da PC, ocasionando a redução de neurônios (CF: $19,700 \pm 0,715$ / CS: $26,292 \pm 0,715$ $p < 0,001$), aumento de células gliais (CF: $38,236 \pm 1,253$ / CS: $23,796 \pm 1,253$ $p < 0,001$) e aumento do índice glia/neurônio

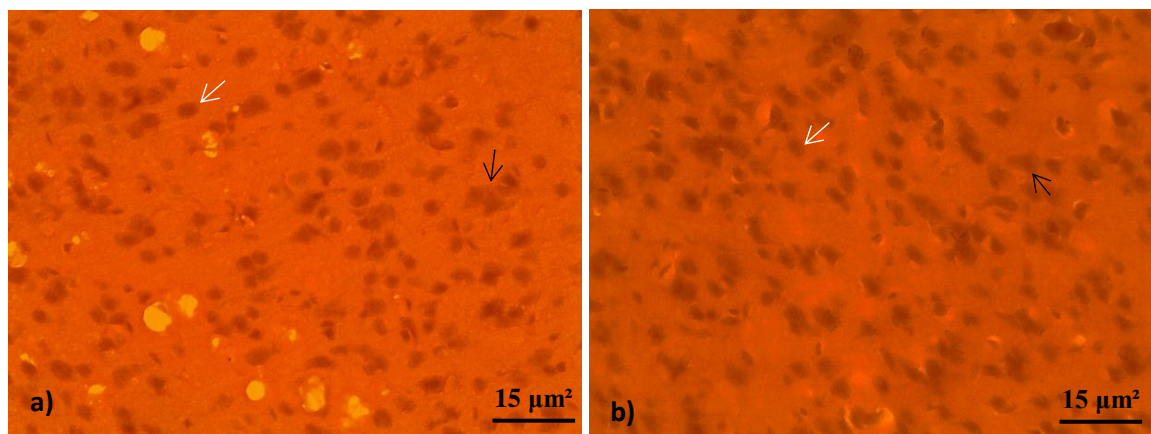
(CF: $1,940 \pm 0,151$ / CS: $0,880 \pm 0,151$ $p < 0,001$) na camada V do córtex S1 (Figura 2). Esse resultado pode ser explicado compreendendo que embora os ISRS desencadeiem uma série de processos intracelulares que provavelmente tem efeitos terapêuticos, sugere-se que os efeitos da serotonina no desenvolvimento são dependentes da idade (KEPSER; HOMBERG, 2015) e a exposição precoce ao antidepressivo durante os períodos críticos do desenvolvimento podem desencadear efeitos negativos duradouros (GLOVER; CLINTON, 2016). Uma das razões pode ser pela debilidade da barreira hematoencefálica, que em roedores, sua formação ocorre no período neonatal e é influenciada por serotonina (KEPSER; HOMBERG, 2015). Assim, níveis de serotonina alterados precocemente podem levar à anormalidades estruturais e funcionais do cérebro (KEPSER; HOMBERG, 2015).

A PC experimental também levou a redução na espessura do córtex S1 em comparação com o grupo CS (PCS: $1614,304 \pm 42,21$ / CS: $1813,100 \pm 42,21$ $p = 0,005$), sugestivo de que a conectividade cerebral também parece estar alterada com a lesão precoce. Estudos demonstraram que após a lesão cerebral perinatal hipóxico isquêmica, os circuitos talamocortical e sensoriomotor podem estar reduzidos ou interrompidos (COQ et al., 2016) e foi sugerido que a conectividade corticoespinhal é diminuída (WENDLER, 2013), resultando possivelmente em uma atrofia cortical.

Embora os animais submetidos a PC associada à manipulação serotoninérgica com fluoxetina não tenha apresentado diferença significativa em relação ao PCS quanto ao número de células no córtex S1, a intervenção farmacológica foi capaz de promover o aumento da espessura dessa região (PCF: $1760,397 \pm 47,202$ / PCS: $1614,304 \pm 42,21$ $p = 0,005$). Alguns aspectos podem ter contribuído para a restauração dessa morfologia cortical, incluindo a extensa arborização do sistema serotoninérgico inervando diversas áreas cerebrais a fim de manter a homeostase do sistema (ARTIGAS, 2013). Estudos, utilizando modelos animais de acidente vascular encefálico isquêmico, demonstraram os efeitos do ISRS na melhora dos danos estruturais e funcionais após isquemia cerebral, desempenhando papel no mecanismo anti-inflamatório mediado pela neuroproteção, melhora da autoregulação do fluxo sanguíneo cerebral e neuroplasticidade (SIEPMANN et al., 2015). Além disso, as células gliais aumentadas no grupo PCF podem ter contribuído de forma conjunta nessa fase de recuperação, atuando na remodelação da matriz extracelular e na montagem de um nicho neurogênico pós-lesão (TITOMANLIO et al., 2016).

Assim, as alterações histomorfométricas observadas no presente estudo evidenciam as prováveis bases fisiopatológicas da PC à nível de sistema nervoso central (SNC), sendo preditores de desordens funcionais característicos desta patologia como a redução da locomoção (SILVA et al., 2016), prejuízo na coordenação motora inclusive nas funções orofaciais (LACERDA et al., 2017a) e déficit sensorial e cognitivo (COQ et al., 2016). Além disso, o tratamento neonatal com fluoxetina na PC experimental demonstrou não atenuar esses danos histológicos provocados pela PC, mas foi capaz de promover o aumento da espessura do córtex S1, revelando que os mecanismos da fluoxetina na PC experimental necessita de maiores investigações. Inclusive a dose administrada pode ter sido elevada para esta população que ainda está em processo de desenvolvimento neurológico, em que os animais podem ter sido expostos à concentrações acima do nível benéfico.

Assim, devido à imprecisão dos riscos e benefícios da fluoxetina na PC, sugerimos novos estudos para compreender os efeitos da manipulação do sistema serotoninérgico com outras doses e outras formas de manipulação como, por exemplo, com suplementação de triptofano na dieta. Além disso, seria interessante avaliar outros aspectos morfológicos do SNC como a densidade dendrítica e a medula espinhal para melhor elucidar o mecanismo de alteração do impulso nervoso na PC.



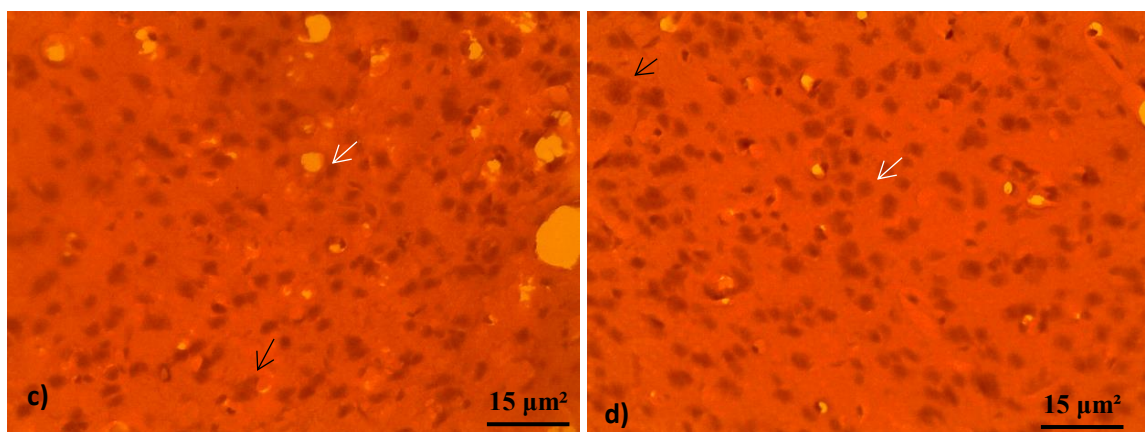


Figura 1: Imagens capturadas através de microscópio óptico (40x) das secções coronais do encéfalo coradas com hematoxilina-eosina, demonstrando as células neuronais (seta preta) e gliais (seta branca) na camada V do córtex S1, dos grupos experimentais Controle Salina (a), Controle Fluoxetina (b), Paralisia Cerebral Salina (c) e Paralisia Cerebral Fluoxetina (d).

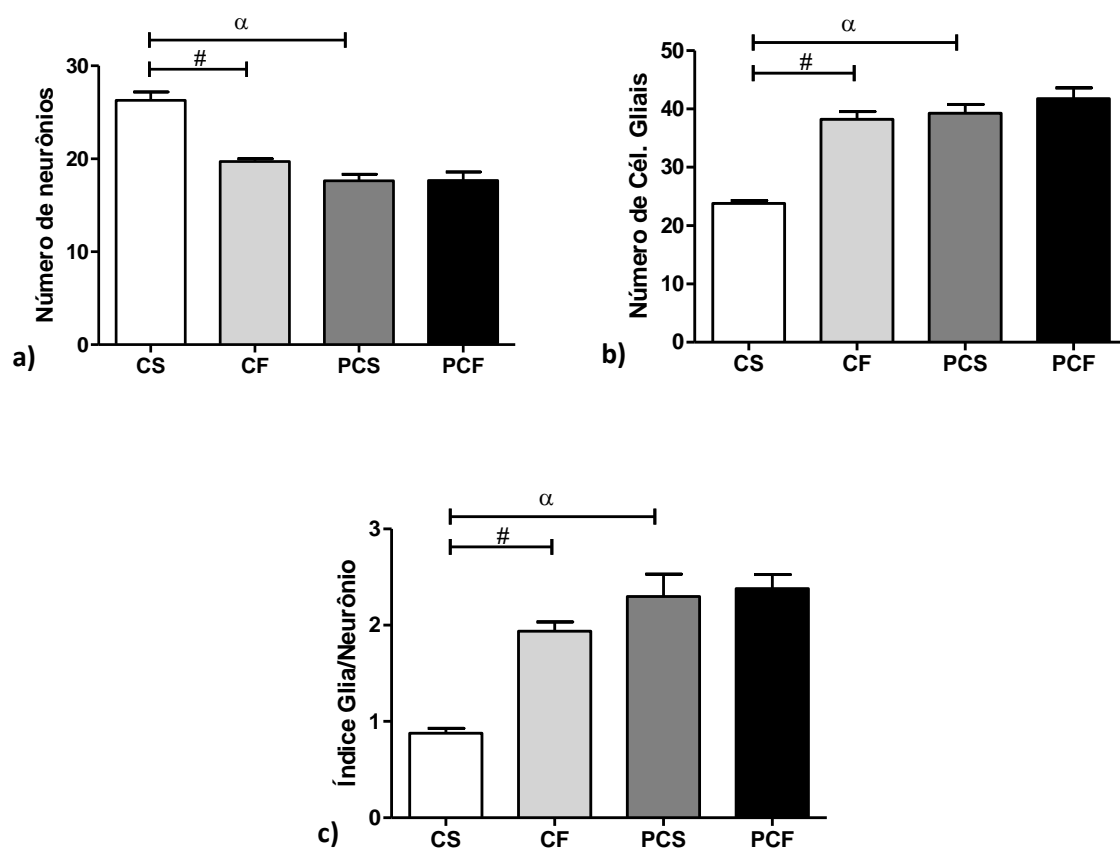


Figura 2: Número de neurônios (a), Número de células gliais (b) e Índice Glia/Neurônio (c) dos grupos Controle Salina (CS, n = 5), Controle Fluoxetina (CF, n = 5), Paralisia Cerebral Salina (PCS, n = 5) e Paralisia Cerebral Fluoxetina (PCF, n = 4). Os dados foram expressos em média ± EPM. Anova Two-Way e pós-teste de

Bonferroni. α PCS vs. CS ($p < 0,05$); #CF vs. CS ($p < 0,05$); *PCF vs. PCS ($p < 0,05$).

Conclusões

A PC experimental provocou danos histomorfométricos cerebrais, evidenciados através da redução do número de neurônios, aumento o número de células gliais, além da redução na espessura do córtex S1. Sendo que a manipulação serotoninérgica neonatal com fluoxetina demonstrou não atenuar os danos histológicos decorrentes da PC, mas aumentou a espessura do córtex S1, estabelecendo a necessidade de estudos futuros investigando a eficácia da fluoxetina na PC experimental.

Referências

- ANDERSON, V.; SPENCER-SMITH, M.; WOOD, A. **Do children really recover better? Neurobehavioural plasticity after early brain insult***Brain*, 2011.
- ARTIGAS, F. Pharmacology & Therapeutics Serotonin receptors involved in antidepressant effects. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 137, n. 1, p. 119–131, 2013.
- COQ, J. et al. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization : Implications for cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p. 95–108, 2008.
- COQ, J. O. et al. Prenatal ischemia deteriorates white matter, brain organization, and function: Implications for prematurity and cerebral palsy. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 58, p. 7–11, 2016.
- DODGE, N. N. **Cerebral Palsy: Medical Aspects***Pediatric Clinics of North America*, 2008.
- FIDALGO, S.; IVANOV, D. K.; WOOD, S. H. Serotonin: From top to bottom. **Biogerontology**, v. 14, n. 1, p. 21–45, 2013.
- GLOVER, M. E.; CLINTON, S. M. International Journal of Developmental Neuroscience Of rodents and humans : A comparative review of the neurobehavioral effects of early life SSRI exposure in preclinical and clinical research. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 51, p. 50–72, 2016.
- JENSEN, F. E. The role of glutamate receptor maturation in perinatal seizures and brain injury. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 20, n. 3–5, p. 339–347, 2002.
- JIANG, X.; NARDELLI, J. Neurobiology of Disease Cellular and molecular introduction to brain development. **Neurobiology of Disease**, v. 92, p. 3–17, 2016.

JONES, M. W. et al. Cerebral Palsy: Introduction and Diagnosis (Part I). **Journal of Pediatric Health Care**, v. 21, n. 3, p. 146–152, 2007.

KANNAN, S. et al. Decreased cortical serotonin in neonatal rabbits exposed to endotoxin in utero. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 31, n. 2, p. 738–749, 2010.

KEPSER, L.; HOMBERG, J. R. The neurodevelopmental effects of serotonin : A behavioural perspective. **Behavioural Brain Research**, v. 277, p. 3–13, 2015.

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

KONOPASKE, G. T. et al. Effect of Chronic Exposure to Antipsychotic Medication on Cell Numbers in the Parietal Cortex of Macaque Monkeys. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 6, p. 1216–1223, 2007.

KRIGGER, K. W. Cerebral Palsy : An Overview. **American Family Physician**, v. 73, n. 1, p. 91–100, 2006.

LACERDA, D. C. et al. Orofacial functions in experimental models of cerebral palsy: A systematic review. **Journal of Oral Rehabilitation**, n. 3, 2017a.

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

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

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

MOCKFORD, M.; CAULTON, J. M. The Pathophysiological Basis of Weakness in Children With Cerebral Palsy. **Pediatric Physical Therapy**, v. 22, n. 2, p. 222–233, 2010.

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

PATEL, D. R. et al. **Developmental disabilities across the lifespan** Disease-a-Month Elsevier Inc., 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.disamonth.2010.02.001>>

PAVÃO, S. L.; ROCHA, N. A. C. F. Sensory

processing disorders in children with cerebral palsy. **Infant Behavior and Development**, v. 46, p. 1–6, 2017.

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

QIU, A.; YANG, Z.; LI, Z. Recent perspectives of cerebral palsy (CP) in children: a review. **Minerva Pediatrica**, v. 69, 2017.

REINEBRANT, H. E.; WIXEY, J. A.; BULLER, K. M. Neonatal hypoxia-ischaemia disrupts descending neural inputs to dorsal raphé nuclei. **Neuroscience**, v. 248, p. 427–435, 2013.

ROBINSON, S. et al. Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic-ischemic insults in rats. **Neurobiology of Disease**, v. 18, n. 3, p. 568–581, 2005.

ROCHA-FERREIRA, E.; HRISTOVA, M. Plasticity in the Neonatal Brain following Hypoxic-Ischaemic Injury. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 1–16, 2016.

SIEPMANN, T. et al. Selective serotonin reuptake inhibitors to improve outcome in acute ischemic stroke: possible mechanisms and clinical evidence. **Brain and Behavior**, v. 5, n. 10, p. n/a-n/a, 2015.

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

STAVSKY, M. et al. Cerebral Palsy—Trends in Epidemiology and Recent Development in Prenatal Mechanisms of Disease, Treatment, and Prevention. **Frontiers in Pediatrics**, v. 5, n. February, p. 1–10, 2017.

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

TITOMANLIO, LUIGI; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, DAVID; MANGANOZZI, L.; MORETTI, RAFFAELLA; VEXLER, ZINAIDA S.; GRESSENS, P. Pathophysiology and neuroprotection of global and focal perinatal brain injury: lessons from animal models. **Pediatr Neurol**, v. 52, n. 6, p. 566–584, 2016.

WENDLER, D. S. Problems with the consensus definition of the therapeutic misconception. **Journal of Clinical Ethics**, v. 24, n. 4, p. 387–394, 2013.

WHITAKER-AZMITIA, P. M. Serotonin and Development 1. **Handbook of Behavioral Neuroscience**, v. 21, p. 309–323, 2010.