

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ETHIANE SEGABINAZI

**ANÁLISE COMPORTAMENTAL DA ASSOCIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL À
LIPOPOLISSACARÍDEO E ASFIXIA INTRAUTERINA**

Porto Alegre

Julho/2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

ETHIANE SEGABINAZI

**ANÁLISE COMPORTAMENTAL DA ASSOCIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO PRÉ-NATAL À
LIPOPOLISSACARÍDEO E ASFIXIA INTRAUTERINA**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel (a) em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra . Simone Marcuzzo

Porto Alegre

JULHO/2013

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por sempre ouvir minhas preces.

A minha orientadora Simone Marcuzzo, por todos os ensinamentos, pela paciência, compreensão, pelo apoio em todas as fases desse trabalho e pelo exemplo de profissional.

Ao professor Marcos Frizzo, Samir Khal de Souza e a todos os membros do Laboratório de Neurobiologia Celular, pela contribuição nesse trabalho, que foi fundamental para a concretização do mesmo.

A todos os amigos do Laboratório de Histofisiologia Comparada: Felipe, Marília, Pamela, Otávio, André, Figue, Cris, pela amizade, parceria, sugestões e por tornar os dias de trabalho duro mais agradáveis.

Um agradecimento especial a Silvia ,Francele e Maria Augusta por todos os ensinamentos ,amizade, pelo coleguismo e apoio.

Aos meus amigos Marcus Michels, Ane, Carla, Marcus Kulmman, Mel e Igor por tudo, pelas risadas , companheirismo e apoio, vocês estão no meu coração.

As minhas amigas Thainá e Josiane, por estarem sempre do meu lado ainda que a distância, vocês são muito especiais pra mim.

As tias: Jenny e Leonida Girardi, por todo o carinho, preocupação, torcida e por devotarem a mim, amor de mãe, por me acolherem quando eu precisava de colo.

Aos meus orientadores da vida, Sergio Francisco Segabinazi e Margarida Segabinazi, por todo apoio, amor incondicional e ensinamentos. Não tem como descrever a nossa história em poucas linhas, mas posso dizer que vocês são as pessoas que mais amo na vida, os meus pilares que tantas vezes me sustentaram quando eu já não tinha forças. Obrigada por tudo!

Agradeço a minha irmã, Fabiane Segabinazi, por depositar confiança em mim e fazer com eu confiasse em mim mesma. Agradeço a ti e ao Erasmo por terem me dado os meus sobrinhos Felipe e a Carmela, que mesmo a distância, fazem a minha vida muito mais feliz. Eu AMO MUITO VOCÊS!

Ao meu irmão, Alexandre Segabinazi, pela parceria de longa data, pela grande amizade, por tudo que passamos juntos! Obrigada, EU TE AMO!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
RESUMO.....	9
1.INTRODUÇÃO.....	10
1.1Inflamação pré-natal.....	13
1.2 Asfixia Perinatal.....	17
1.3Efeito da inflamação pré-natal e asfixia intrauterina em humanos e modelos animais	21
2 JUSTIFICATIVA.....	22
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
4.TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
6 REFERÊNCIAS ADICIONAIS.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

PC	Paralisia Cerebral
LPV	Leucomalácia Periventricular
LPS	Lipopolissacarídeo
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
IL-1 β	Interleucina -1 β
IL-6	Interleucina-6
Ca ²⁺	Íon Cálcio
NMDA	N-metil-D-Aspartato
Pre-OL	Pré-oligodendrócitos
O ₂	Oxigênio Molecular
Na ²⁺	Íon Sódio
N ₂	Nitrogênio Molecular
H/I	Hipóxia- isquemia
E	Dia embrionário
P	Dia pós-natal
ROS	<i>Reactive Species of Oxygen</i>
RNS	<i>Reactive Species of Nitrogen</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TLRs	<i>Toll Like Receptors</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação Topográfica da PC	12
Figura 2 - Mecanismo de ação do LPS sobre células imunes periféricas e células do SNC.....	15
Figura 3 - Prováveis mecanismos de dano ao encéfalo fetal pela exposição à inflamação pré-natal.....	16
Figura 4 - Mecanismos de danos a pré-OL após injúria por infecção e/ou H/I.....	19
Figura 5- Protocolo de histerectomia de uma rata no qual se obtém ratos controles de um corno uterino e asfixiados do outro corno uterino.....	46
Figura 6. Desenho Experimental.....	47
Figura 7. Peso dos animais ao longo do período de avaliação (P1 ao P14).....	47
Figura 8. Peso dos diferentes grupos no P30.....	48
Figura 9. Latência de queda dos grupos durante a avaliação no rotarod no P29....	48
Figura 10. Latência de queda dos grupos durante a avaliação no teste de suspensão na barra no P29.....	49
Figura 11.Gráfico expressando a porcentagem de exploração do objeto reposicionado.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fatores de risco para o desenvolvimento de PC11

Tabela 2- Média do dia de manifestação dos sinais físicos e neurológicos dos diferentes grupos.....47

Tabela 3- Locomoção durante o *sample* e *test trial* do teste de objeto reposicionado.....50

RESUMO

A exposição do encéfalo em desenvolvimento a insultos como infecções maternas e asfixia perinatal pode provocar lesões neurológicas permanentes que constituem o substrato da Paralisia Cerebral (PC). Visto que determinadas alterações funcionais comumente observadas em pacientes com PC são pouco mimetizadas nos modelos experimentais desta patologia em ratos, o objetivo desse estudo foi analisar se a combinação da inflamação pré-natal por lipopolissacarídeo (LPS) e asfixia intrauterina reproduz, em ratos, as alterações funcionais encontradas em pacientes com PC. Todos os procedimentos desse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFRGS (nº. 18450). O LPS ou salina foram administrados via i.p. em ratas prenhes entre o 17º e o 21º dia gestacional e no 22º, foi realizada a asfixia intrauterina, através de uma cesariana, obtendo-se neonatos asfixiados e controles. Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: Controle, Asfixia, LPS e LPS-Asfixia. Os filhotes foram pesados diariamente entre o 1º e 14º dia pós-natal (P1 ao P14) e no P30. O desenvolvimento motor foi avaliado pela bateria de testes dos marcos do desenvolvimento entre o P3 e P14. Aos 29 dias, os animais foram submetidos às avaliações no rotarod, suspensão na barra e teste de objeto reposicionado para analisar respectivamente, equilíbrio e coordenação, força muscular e memória espacial. Os resultados mostraram que a inflamação gestacional, combinada ou não à asfixia, diminuiu o peso corporal dos filhotes a ela submetidos, bem como atrasou o desenvolvimento da resposta de sobressalto e colocação do membro posterior e acelerou a preensão palmar. Não foi detectado déficit em nenhum dos grupos experimentais nos testes de rotarod, suspensão na barra e teste de objeto reposicionado. Logo, o modelo experimental testado nesse estudo causa alterações sutis do desenvolvimento, mas não provoca disfunções motoras severas como as observadas no âmbito clínico, nem causa danos cognitivos característicos de humanos expostos a esses insultos no período gestacional.

1. INTRODUÇÃO

A Paralisia cerebral (PC) consiste em um grupo de distúrbios do movimento, postura, tônus muscular e disfunções motoras provocadas por lesões não progressivas que ocorrem no encéfalo imaturo (período pré-natal, perinatal ou pós-natal) durante os primeiros 3-4 anos de vida (Minciu, 2012).

Estima-se que de cada 1.000 nascidos vivos em países desenvolvidos, 1,5 terão a forma moderada de PC e 2,5 terão a forma severa, enquanto em países subdesenvolvidos a estimativa aumenta para 7 casos a cada 1000 nascidos vivos (Stanley e col. , 2000; Scpe, 2002; Winter e col., 2002). Embora não existam estudos conclusivos a respeito, estima-se que a incidência de PC no Brasil seja alta devido à falta de acompanhamento pré-natal e neonatal.

Os pacientes com as formas leves da patologia têm praticamente a mesma expectativa de vida que indivíduos neurotípicos, no entanto, 50% das crianças portadoras da forma grave evoluem a óbito antes de completarem 20 anos de vida (Hutton e col, 1994). Se por um lado os avanços tecnológicos reduziram a mortalidade infantil entre prematuros, por outro, eles acabaram aumentando a incidência de PC. A tecnologia reduziu a mortalidade infantil às custas de um aumento de déficits neurológicos (Wilson-Costello e col., 2005; Vincer e col., 2006).

Os insultos que podem desencadear a PC são vários e muitas vezes podem ocorrer em conjunto durante os períodos pré-natal, perinatal ou pós-natal. O período pré-natal parece ser o mais crítico para o desenvolvimento de lesões encefálicas, uma vez que 70% a 80% dos casos registrados de PC tiveram histórico de exposição a fatores de risco nessa fase do desenvolvimento neurológico (Johnston e col., Hoom e col., 2006; Krigger, 2006). Em relação ao período perinatal, os principais insultos que podem ocorrer na fase *antepartum* são asfixia, infecções e traumas, enquanto - no *postpartum* os eventos mais comuns são meningite, encefalite e icterícia neonatal (Johnston, Hoom, 2006; Krigger, 2006). Parto prematuro, baixo peso ao nascimento, gestações múltiplas e baixa idade gestacional também aumentam a chance da criança desenvolver PC (Tabela 1, Hagberg e col., 2001 Derrick e col., 2004, Sankar e col., 2005, Ancel e col., 2006),

Tabela 1: Fatores de risco para o desenvolvimento de PC. Adaptado de Jones, 2007.

TABELA 1. Fatores de risco associados com a Paralisia Cerebral		
Pré natal	Perinatal	Pós-natal
Hipóxia	Asfixia	Asfixia
Desordens genéticas	Nascimento prematuro <32 semanas ou <2500g	Convulsão até 48h do nascimento
Desordens metabólicas	Incompatibilidade sanguínea	Infarto cerebral
Infecções intrauterinas	Infecção	Hiperbilirrubinemia
Gestação múltipla	Presença de anormalidades fetais	Sepsis
Distúrbios trombofílicos	Ruptura placentária	Dificuldade respiratória
Exposição teratogênica	Parto instrumental	Síndrome/crônica doença pulmonar
Corioamnionite		Meningite
Febre materna		Esteróides pós natal
Exposição a tóxicos		Hemorragia intraventricular
Mal formação das estruturas encefálicas		Leucomalácia periventricular
Restrição do crescimento intra-uterino		
Trauma abdominal		
Insultos vasculares		

Dados de Gibson e col., 2003; Han, Bang, Lim, Yoon e Kim, 2002; Kuban e Leviton, 1994; Naeye e col., 1989; Nelson, 1989; Nelson e Ellenberg, 1986.

O retardo ou atraso no desenvolvimento motor, persistência de reflexos primitivos ou anormais, e a incapacidade de realizar reflexos protetores são sinais clínicos muito relevantes no momento do diagnóstico da PC (Russman e col., 1997). A base patofisiológica desse transtorno motor é constituída pela leucomalácia periventricular (LPV; lesão na substância branca encefálica), hemorragia intraventricular e lesão no córtex cerebral, núcleos da base, cerebelo e tálamo (Folkberth, 2005; Kadhim e col., 2005). A LPV resulta da vulnerabilidade dos oligodendrócitos imaturos antes da 32^o semana de gestação. Alguns pesquisadores acreditam que a asfixia perinatal seja o principal fator patogênico para a LPV, devido a uma peculiar vulnerabilidade das células precursoras de oligodendrócitos à isquemia (Volpe, 2001).

O grau de comprometimento motor observado em indivíduos com PC tende a ser proporcional a gravidade das lesões encefálicas. Talvez, a complexa etiologia desse distúrbio, baseada em uma grande variedade de fatores associados, explique a sua variabilidade de manifestações clínicas. A PC pode ser classificada conforme a distribuição topográfica do envolvimento dos membros em hemiplégica, diplégica e quadriplégica, e também conforme o tipo de desordem motora em espástica (85%), discinética (7%), atáxica (5%), hipotônica (0,5%) e mista (2,5%) (Staley e col., 2000).

A forma quadriplégica é a mais grave, caracterizada pelo comprometimento dos quatro membros, causada por lesão encefálica bilateral extensa, simétrica ou não. A PC diplégica é a forma mais comum de PC, e leva a espasticidade dos

membros inferiores. O sinal clínico relevante dessa forma consiste no atraso da aquisição da marcha independente, a qual na maioria das vezes é desempenhada após um ano de idade. Quando não diagnosticada precocemente, a espasticidade provoca a retração dos músculos adutores da coxa e a criança tende a deambular nas pontas dos pés. Por fim, - a hemiplegia é configurada pelo envolvimento de um hemicorpo (um lado do corpo), há uma assimetria de tônus muscular e da movimentação espontânea, - especialmente nos membros superiores. O paciente tende a usar preferencialmente uma das mãos, enquanto a outra permanece fechada (Figura 2; Monteiro, 2011).

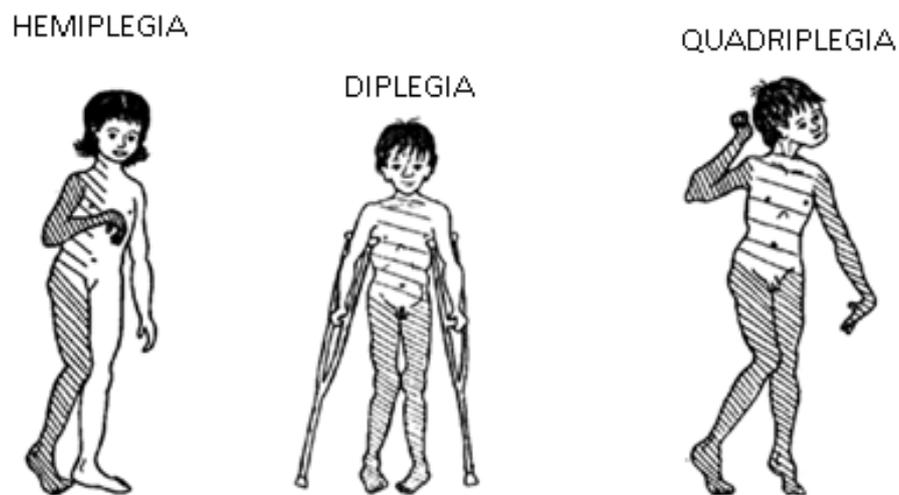


Figura 1. Classificação Topográfica da PC (Lance, 1990).

Quanto às comorbidades físicas, os ossos e as extremidades corporais podem apresentar alterações em seus comprimentos (Novacheck; Gage, 2007), assim como atraso no crescimento corporal devido à falta de atividade motora (Henderson e col., 2007; Tamega e col., 2011;) e baixo peso provocado por distúrbios de deglutição (Ministério da Saúde, 2013).

As limitações neuromotoras que as crianças com PC sofrem podem dificultar o seu processo de aprendizagem por restringir suas experiências de interação com o ambiente. A literatura refere que 35% a 53% dos pacientes com PC possuem

prejuízo de funções executivas, sobretudo as que estão relacionadas à atenção, necessárias a elaboração de novas estratégias frente a problemas, ou seja, flexibilidade de pensamento (Shallice, 2002; Rosenbaum e col., 2007; Straub; Obrzut, 2009; Pirila e col., 2011; Ministério da Saúde, 2013). A restrição motora também exerce influência negativa sobre o desenvolvimento da linguagem, pois dificulta a interação do paciente com outras pessoas, objetos, de modo geral, com o ambiente ao seu redor, diminuindo as possibilidades da criança ampliar seu repertório linguístico, podendo prejudicar estruturas envolvidas em processos cognitivos, de linguagem e comportamento social (Gren; Hurvitz, 2007). O acompanhamento dos marcos motores é fundamental, pois eles influenciam substancialmente no desenvolvimento da linguagem (Ministério da Saúde, 2013).

1.1. Inflamação Pré-Natal

Infecções por toxoplasmose, citomegalovírus e rubéola durante a gestação podem causar sérias lesões neurológicas (Reddihough e Collins, 2003). Entre todas as infecções maternas, a que está mais associada com a PC causa a corioamnionite bacteriana, uma infecção perinatal das membranas fetais (Wang e col., 2008). A via mais comum de infecção intrauterina se dá através de bactérias que colonizam a vagina e ascendem para o colo do útero e dele para decídua e miométrio. A infecção da decídua pode acarretar resposta inflamatória maternal e permite a passagem de bactérias e/ou mediadores inflamatórios através das membranas fetais, fluido amniótico para o próprio feto, provocando resposta inflamatória sistêmica no feto, desencadeando a Síndrome da Resposta Inflamatória Fetal (Wu e col., 2000; Yoon e col., 2003; Toso e col., 2005). Essa síndrome consiste em elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α ,) no plasma e líquido cefalorraquidiano fetal e altas concentrações de IL-6 e IL-8 no cordão umbilical do feto (Gomez e col., 1998; Romero, 1900; Romero, 2000), estando fortemente relacionada ao desenvolvimento de PC (Nelson e col., 1998).

Anteriormente, a asfixia perinatal era considerada a causa mais frequente de PC, entretanto, sinais clínicos atribuídos a asfixia, como o baixo escore de Apgar, também podem ser provocados pela corioamnionite bacteriana (Badawi e col. 1998; Grether & Nelson, 1998; Lieberman e col., 2000). Em um estudo, 38% dos casos de

PC quadriplégica, a forma mais grave da patologia, foram associados com a corioamnionite bacteriana. Dentre os neonatos prematuros participantes do estudo que tiveram histórico de inflamação pré-natal, 38% desenvolveram PC e 70% nasceram com menos de 28 semanas de gestação (Girard, 2009). Além disso, corioamnionite é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de H/I neonatal, uma vez que a inflamação gestacional pode sensibilizar o encéfalo do neonato a eventos isquêmicos por meio da ativação de caspase-3 e nfkB (fator nuclear k B), moléculas envolvidas na resposta a inflamação e apoptose celular. (Wang e col., 2008). Há relatos na literatura de que a incidência de hemorragia peri/intraventricular é significativamente alta em neonatos prematuros que sofreram inflamação intrauterina (Berger e col., 1997).

Experimentalmente, a infecção e a inflamação pré-natal podem ser mimetizadas através da exposição materna no período gestacional ao lipopolissacarídeo (LPS). O LPS está presente na membrana externa de bactérias gram-negativas, sendo considerada uma endotoxina que estimula fortemente o sistema imunológico de animais sadios. A principal consequência da injeção do LPS durante a gestação é a ativação de células do sistema imune fetal, capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, causando dano diretamente ou através da ativação de células locais como a microglia e os astrócitos (Damman, 2001).

Durante a gestação, o sistema imune materno funciona de modo que o organismo da mãe não rejeite o feto, mas ao mesmo tempo os proteja de agentes patogênicos. Citocinas são expressas constitutivamente durante o desenvolvimento do encéfalo fetal e possuem um papel importante nesse processo. Entretanto, qualquer desequilíbrio no padrão de expressão de citocinas no encéfalo fetal pode prejudicar o processo de neurodesenvolvimento. A passagem de citocinas produzidas pelo sistema imune - materno para o feto através da placenta, bem como a produção e secreção de citocinas pelo próprio feto, configuram a alteração imunológica responsável pelo dano neurológico (Burd e col., 2012).

O LPS liga-se a receptores do tipo Toll, ativando o sistema imunológico e iniciando - uma resposta imune adaptativa pela produção de citocinas inflamatórias como o Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Interleucina 1 β (IL-1 β). No SNC, tais citocinas - podem induzir a apoptose de oligodendrócitos, justificando o dano na substância branca - pela inflamação e a degeneração da mielina (Koop, Mediztov, 1999; Damman, 2001; Figura 2).

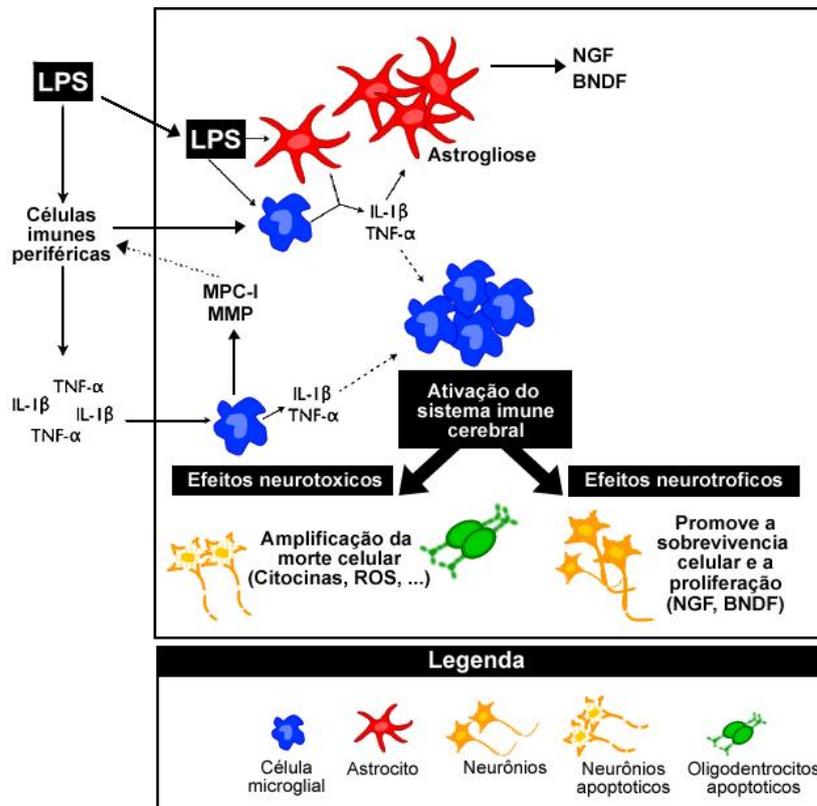


Figura 2. Mecanismo de ação do LPS sobre células imunes periféricas e células do SNC. Modificado de Girard (2009).

Em estudos pré-clínicos, foi observado que o LPS - estimula a microglia a liberar altas quantidades de TNF-α, IL-1β e interleucina 6 (IL-6) (Damman e col., 1997). A ativação da microglia, presente durante o desenvolvimento nos tratos de substância branca para seu remodelamento e crescimento, leva a produção dessas citocinas pró-inflamatórias que podem provocar dano aos neurônios e oligodendrócitos. A microglia ativada também pode causar dano através da excitotoxicidade causada pela geração de metabólitos de glutamato e ácido quinolínico- ou então, pela liberação de produtos oxidativos e nitrosativos. Os pré-oligodendrócitos são pouco resistentes ao estresse oxidativo. A presença de receptores de glutamato permeáveis a íons Ca^{2+} , bem como de receptores NMDA durante o processo de mielinização tornam essas células mais vulneráveis a insultos (Burd et al, 2012). Sabe-se que o LPS é um potente indutor de estresse oxidativo e que o período entre a 24^o a 32^o semana de gestacional coincide com o estágio de desenvolvimento fetal no qual há predominância de pré-oligodendrócitos (pré-OL) na substância branca. Essas células, ao contrário dos oligodendrócitos maduros, são

sensíveis a radicais livres, o que contribui para a mielinização deficiente (Svedin e col., 2005).

A idade gestacional na qual o feto foi exposto a inflamação materna é um fator importante para determinação de um prognóstico para o mesmo (Figura 3). Uma infecção que ocorra no segundo trimestre de gestação pode prejudicar a migração de neurônios pós-mitóticos da zona ventricular para o neocórtex. Assim, a degeneração e a interferência na migração e desenvolvimento neuronal podem acarretar em um desenvolvimento aberrante do córtex cerebral (Leviton e col., 2007, Burd e col., 2012).

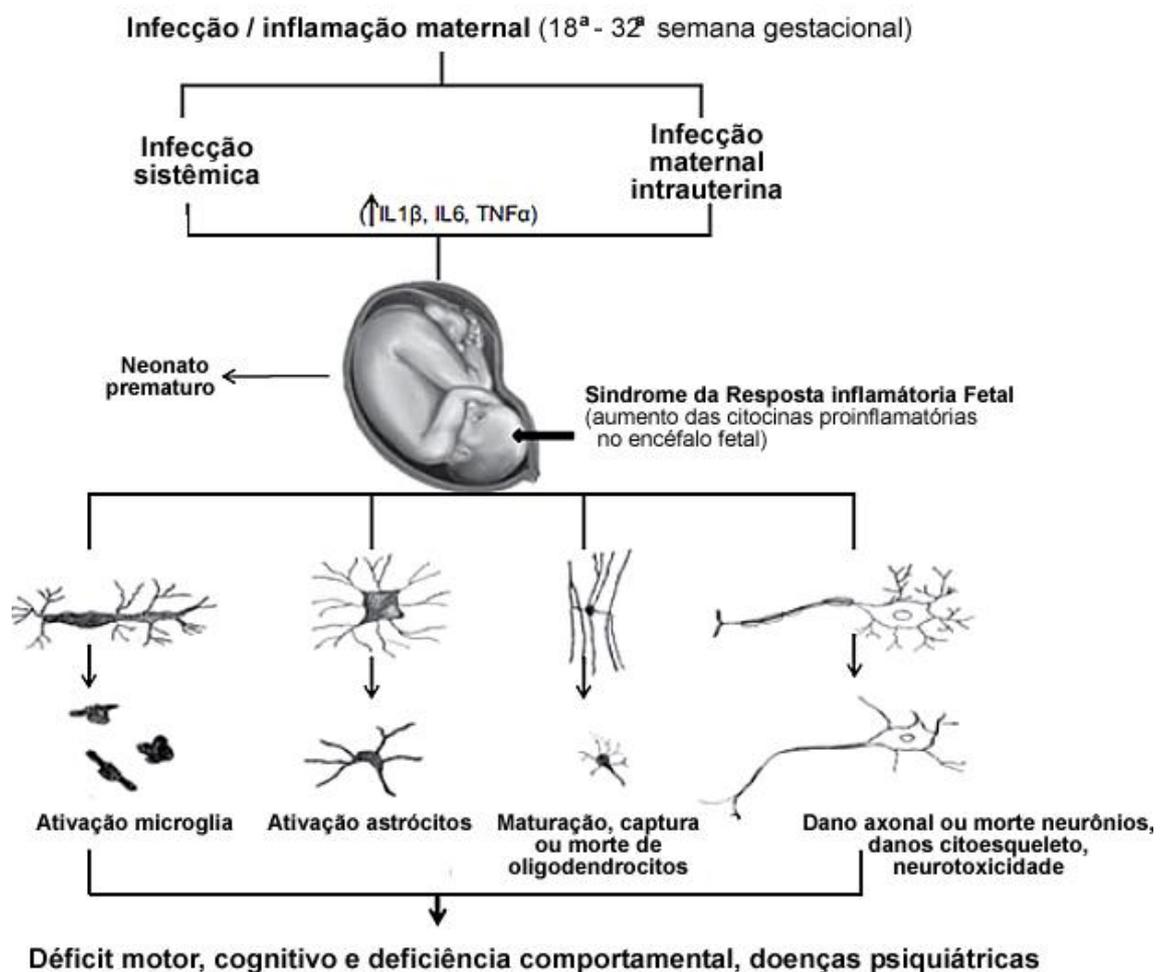


Figura 3. Prováveis mecanismos de dano ao encéfalo fetal pela exposição à inflamação pré-natal. Adaptado de Burd et al, 2012.

1.2. Asfixia Perinatal

A asfixia perinatal é a principal causa de morte e dano neurológico em recém-nascidos e está frequentemente associada a partos difíceis e prolongados. Sua incidência mundial é 2-6/1.000 nascidos vivos (de Haan e col., 2006; Morales e col., 2009). As lesões neurológicas causadas pela asfixia podem levar a PC, epilepsia e retardo mental ou mesmo desordens psiquiátricas na vida adulta, tais como déficit de atenção e esquizofrenia (Hill & Volpe, 1981; Lewis & Murray, 1987; Hill, 1991; Cannon e col., 2002;). A asfixia severa pode ocorrer em fetos próximos do período de nascimento por várias razões, incluindo a compressão do cordão umbilical, descolamento da placenta, contrações uterinas anormais ou incapacidade do neonato iniciar a - ventilação voluntária (de Haan e col., 2006). Sendo assim, - a asfixia pode ocorrer no período *antepartum*, *intrapartum* e *postpartum* e é caracterizada pela diminuição das trocas gasosas acompanhada por acidose metabólica (MacLannan, 1999; van Helden e col., 2007).

O tipo mais comum de asfixia é a global, onde a acidose, a hipercapnia e a hipóxia afetam todo o organismo (Lubec e col., 1997; Loidl e col., 2000; Strackx e col., 2010; Galeano e col., 2011), mas o órgão mais prejudicado, indubitavelmente, é o encefálo. As principais estruturas encefálicas comprometidas pela asfixia são o hipocampo, córtex cerebral e núcleos da base, sobretudo o estriado (Loidl e col., 2000), as quais estão envolvidas no processamento motor, emocional, memmônico e de - aprendizagem (Galeano e col., 2011).

Outro insulto que pode ocorrer no estágio pré-natal ou no momento do parto, é a hipóxia-isquemia, caracterizada pela privação de oxigênio em decorrência da diminuição do fluxo placentário ou sanguíneo do neonato. As consequências a nível molecular e funcional são semelhantes às da asfixia perinatal (Kasdorf & Perlman, 2013). Em modelos animais, a H/I costuma ser mimetizada através de um protocolo que consiste no camplamento da artéria carótida comum direita do animal, que é submetido a um ambiente que contém 82% de N₂ e 8% de O₂ durante 90 min, no 7º dia pós-natal, período no qual o nível de desenvolvimento do encéfalo dos ratos é similar ao recém-nascido humano (Levine, 1960; Rice e col., 1981).

Experimentalmente, a asfixia perinatal pode ser provocada em ratos pelo método de asfixia intrauterina ou anóxia perinatal. Conforme Bjelke e col., 1991, a asfixia intrauterina é realizada pela histerectomia da rata prenhe no 22º dia de

gestação, seguida pelo clampeamento e submersão de um dos cornos uterinos em solução salina a 37° por 15 min enquanto o outro corno é aberto imediatamente aberto e os filhotes são estimulados a respirar, obtendo-se, respectivamente, neonatos asfixiados e controles que devem ser cuidados por mães substitutas. Já o procedimento de anóxia perinatal consiste em expor os filhotes recém-nascidos de parto normal a uma câmara de N₂ 100% durante 20 min, como descrito por Marcuzzo e col. , 2010.

Entre os mecanismos citotóxicos desencadeados pela privação do suprimento de oxigênio, os principais responsáveis pelo dano neuronal são a liberação de aminoácidos excitatórios, aumento do influxo de Ca²⁺ para o meio intracelular, alteração iônica e do pH devido ao acúmulo de ácido láctico e aumento da formação de radicais livres (Loidl e col., 2000). A morte neuronal por excitotoxicidade glutamatérgica é baseada na despolarização da membrana pré-sináptica provocada pela falta de O₂, que resulta em uma descarga sináptica com liberação de glutamato. Na asfixia, a recaptação de glutamato é insuficiente, o que causa acúmulo desse neurotransmissor na fenda sináptica e ligação aos receptores NMDA superexpressos no encéfalo em maturação. O neurônio pós-sináptico é superestimulado e o aumento do influxo de Na⁺, Ca²⁺ e água, culminam em necrose ou apoptose neuronal. (Ferrieiro & Mclean, 2004).

A LPV é caracterizada por uma necrose focal na substância branca periventricular, com perda de células gliais e degeneração de axônios circundada por astrogliose difusa e proliferação microglial (Folkerth e col., 2005). A patogênese da LPV é baseada na interação de três fatores: isquemia cerebral, inflamação/infecção sistêmica e vulnerabilidade intrínseca dos pré-OL, especialmente entre o segundo e terceiro trimestre de gestação humana (Volpe e col., 2011). Dentre esses mecanismos, o mais importante para o dano aos pré-OL parece ser a geração de radicais livres pela microglia ativada, pois é a via final comum tanto da isquemia quanto da inflamação. (Figura 3, Volpe e col., 2011).

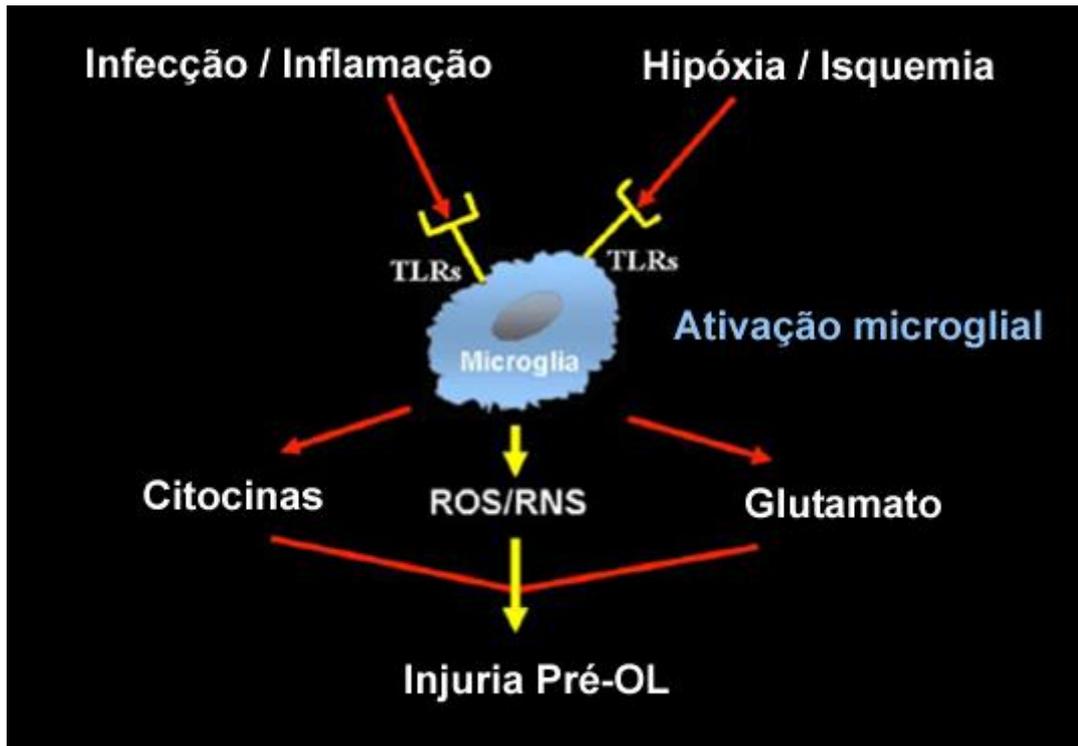


Figura 4. Mecanismos de danos a pré-OL após injúria por infecção e/ou H/I. Adaptado de Volpe, 2011.

1.3. Efeito da inflamação pré-natal e asfixia perinatal em humanos e modelos animais

Estudos clínicos relatam que a inflamação gestacional pode provocar retardo mental e distúrbios visuais, atrasar a aquisição da fala, causar a perda de audição e levar ao desenvolvimento de PC em crianças prematuras, especialmente as que passaram pela corioamionite bacteriana durante a gestação (Pollan e col., 2005, Suppiej e col., 2009). Os principais relatos clínicos a respeito da asfixia além dos distúrbios motores vinculados a PC, se referem a prejuízos cognitivos. Marlow e col. (2005) afirma que crianças de aproximadamente 7 anos que possuíam encefalopatia decorrente de asfixia apresentam déficits de atenção e memória - em relação a crianças que não passaram pela asfixia perinatal.

A PC é a principal causa de deficiência crônica e sofrimento para a população infantil. O recente avanço da neurociência se deve as descobertas sobre a patogênese dos distúrbios e potenciais terapias. Esse progresso não seria possível sem modelos experimentais, muitos dos quais têm por objetivo replicar uma ou mais características da PC em animais em desenvolvimento (Johnston e col., 2006). Os modelos animais que constam na literatura tentam reproduzir as lesões encefálicas

e déficits funcionais encontrados em pacientes com PC através da exposição dos animais aos fatores de risco associados a essa patologia, tais como a inflamação pré-natal e a asfixia perinatal, isolados ou em combinação. Em animais, a inflamação pré-natal induzida por LPS pela via intrauterina, o que simularia uma infecção do trato urogenital durante a gestação, levou a um atraso de alguns aspectos do desenvolvimento sensório-motor. Porém, quando adultos, os animais foram capazes de compensar essa lesão e não apresentaram déficits motores (Toso e col., 2005). Experimentalmente, Dell Anna (2000) utilizou o método de anóxia perinatal (100% de N₂, durante 25 min) para estudar os efeitos da privação de oxigênio nas primeiras horas de vida de ratos. Tal estudo mostrou que os animais asfixiados não tiveram o desenvolvimento motor alterado, mas apresentaram hiperatividade motora que se dissipou com o tempo. Foi constatado um déficit de memória espacial que se manteve até os 45 dias. Utilizando o método de H/I neonatal em ratos (92% de N₂ e 8% O₂), Rojas (2012) verificou prejuízo da memória não-espacial durante o teste de reconhecimento de objeto, mas não encontrou déficit de equilíbrio e coordenação motora na fase adulta. Após expor filhotes à asfixia intrauterina de 19 min, Galeano (2011) constatou que os animais asfixiados têm sua atividade locomotora espontânea reduzida e déficit de memória na tarefa do labirinto aquático de Morris.

No modelo proposto por Girard (2009), a combinação de inflamação pré-natal por LPS e H/I pós-natal em ratos causou uma menor atividade locomotora espontânea e prejuízo da coordenação motora, bem como alterações morfológicas encefálicas tais como: astrogliose e proliferação de células microgliais no corpo caloso, aumento dos ventrículos laterais, lesão no córtex cerebral, caudado e putamen e cápsula interna, além de outras estruturas.

Os modelos animais de PC são tão heterogêneos como a própria desordem em si (Johnston e col., 2006). Estudos que utilizam modelos animais de inflamação no período gestacional e asfixia intrauterina possuem um papel chave na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos dos danos encefálicos provocados por insultos pré-natais. A melhor compreensão a respeito desses mecanismos possibilita a investigação de novas alternativas terapêuticas, bem como um melhor prognóstico para os neonatos. Estudos têm procurado associar agressores a fim de causar os efeitos deletérios sinérgicos e então produzir um fenótipo mais aproximado da PC (Strata e col., 2004, Girard e col., 2009). Não foram encontrados estudos sobre os

efeitos da associação de exposição ao LPS em período embrionário e a asfixia intrauterina em ratos, o que simularia melhor o que acontece na clínica.

2. JUSTIFICATIVA

O conjunto de déficits decorrentes da PC ou o próprio prejuízo motor *per se* associado a essa patologia influenciam o desempenho funcional, provocando inatividade e incapacidade, além de impactar sobre a qualidade de vida dessas crianças. Além disso, a incidência de PC permanece estável durante as últimas décadas, especialmente devido à falta de intervenções terapêuticas eficientes, o que reflete as incertezas a respeito da patofisiologia desse distúrbio. Para a elaboração de estratégias terapêuticas e preventivas, maiores entendimentos sobre as alterações biológicas inerentes a PC são necessários, um conhecimento que pode ser obtido através da pesquisa básica. Logo, faz-se necessário um modelo animal que possua um fenótipo mais semelhante ao observado em seres humanos - em relação a essa patologia.

Apesar da asfixia perinatal ser considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento da PC, outros eventos agressores já existentes como a inflamação pré-natal podem estar associados, exercendo um papel importante na patogênese da injúria.

A realização da asfixia intrauterina de forma isolada em estudos experimentais mimetiza o que ocorre na asfixia perinatal em seres humanos através da privação de oxigênio durante o nascimento, provocando alterações como acidose, hipercapnia e hipóxia. Além disso, é bem documentado que a exposição ao LPS no período embrionário torna o encéfalo imaturo mais vulnerável à H/I e, ainda, a infecção de membranas fetais (corioamnionite bacteriana) é um fator de risco para a anóxia perinatal. A combinação de uma inflamação pré-natal e asfixia durante o nascimento aumenta - o risco de desenvolvimento da PC, sugerindo uma possível interação desses mecanismos patofisiológicos. Desta forma, a associação da inflamação pré-natal por LPS e asfixia intrauterina em ratos pode ser relevante para reproduzir os danos encefálicos observados em indivíduos com PC, permitindo posterior estudo de estratégias terapêuticas mais eficazes frente a esse distúrbio.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar se a associação da inflamação pré-natal e asfixia perinatal, fatores predisponentes à PC em humanos, reproduz os déficits comportamentais dessa patologia em ratos, buscando assim, um modelo animal mais fidedigno desse distúrbio.

3.2. Objetivos Específicos

- Analisar se há alteração no desenvolvimento motor dos animais expostos à inflamação pré-natal por LPS e asfixia intrauterina através da pesagem e avaliação diária dos marcos do desenvolvimento;
- Analisar o equilíbrio e coordenação, destreza dos membros anteriores e a memória espacial dos animais expostos à inflamação pré-natal por LPS e asfixia intrauterina através dos testes de *rotarod*, objeto reposicionado e suspensão na barra, respectivamente.

4. TRABALHO EXPERIMENTAL NA FORMA DE ARTIGO CIENTÍFICO

A associação da inflamação e asfixia intrauterina não reproduz o fenótipo de paralisia cerebral em ratos

Ethiane Segabinazi^a, Maria Augusta Timmen^{a,c}, Francele Valente Piazza^{a,c}, Marília Marques^a, Otavio Americo Augustin^a, Marcos Emilio Frizzo^b, Samir Khal de Souza^b, Simone Marcuzzo^{a,c*}

^aLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

^bLaboratório de Neurobiologia Celular, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^cPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brazil

Paravras-chave: Paralisia cerebral; Lipopolissacarídeo; Infecção maternal; desenvolvimento motor; asfixia intrauterina, memória espacial

*Autor correspondente: Simone Marcuzzo

Laboratório de Histofisiologia Comparada

Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Sarmiento Leite, 500. CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS. Brazil

E-mail: simone.marcuzzo@ufrgs.br

Tel.: +55-55-33083624

Artigo a ser submetido à *Brain Research*

RESUMO

Infecções maternas no período gestacional estão frequentemente associadas à asfixia perinatal e, de fato, aumentam em 70% o risco de essas crianças apresentarem paralisia cerebral (PC). Assim, o objetivo desse estudo foi analisar se há um sinergismo entre esses dois fatores de risco que mimetize, em ratos, as alterações funcionais observadas em pacientes com PC. A inflamação pré-natal foi induzida por injeções de LPS no período gestacional (E17- E21). No E22, as ratas foram submetidas à cesariana. Em parte dessas ratas, um dos cornos uterinos foi clampeado e submetido à asfixia a 37° C, enquanto nas demais ratas foi realizada uma histerectomia imediatamente. Dessa forma, obtiveram-se neonatos asfixiados e controles, respectivamente que foram entregues a mães substitutas. Os animais foram divididos nos seguintes grupos: controle, asfixia, LPS e LPS-asfixia. O peso corporal dos filhotes foi registrado do P1 ao P14 e no P30. O desenvolvimento motor foi avaliado utilizando os marcos do desenvolvimento, entre P3 e P14. No P29, os animais foram submetidos aos testes do objeto reposicionado, suspensão na barra e a rotarod. Apenas o fator LPS interferiu na aquisição de peso corporal dos animais ao longo de todos os dias de avaliação e alterou alguns aspectos do desenvolvimento motor. Entretanto, não foram encontradas diferenças - entre os grupos experimentais nos testes motores e de memória. Sendo assim, os fatores em estudo provocam alterações comportamentais sutis e efêmeras, não condizentes com o fenótipo da PC.

1. INTRODUÇÃO

A Paralisia Cerebral (PC) é descrita como um grupo de desordens permanentes do movimento e da postura, causadas por lesões não-progressivas que ocorrem durante o desenvolvimento fetal ou após o nascimento, quando o encéfalo ainda encontra-se em fase de maturação (Fairhurst, C. 2012).

A disfunção motora característica da PC pode ser acompanhada por distúrbios sensoriais, cognitivos, de comunicação, problemas musculoesqueléticos e até mesmo epilepsia (Bax e col., 2005). O substrato neuropatológico da PC é constituído pela leucomalácia periventricular, hemorragia intraventricular e prejuízo funcional/estrutural do córtex, núcleos da base, cerebelo e tálamo (Folkberth, 2005; Kadhim e col., 2005). Tais lesões são provocadas por insultos que podem ocorrer durante a gestação, no parto ou no início da vida, tais como exposição à inflamação maternal, asfixia perinatal, trauma e meningite (Blair; Watson, 2005; Johnston & Hoom, 2006; Krigger, 2006).

A inflamação perinatal pode levar a síndrome inflamatória fetal, que constitui um importante fator de risco para lesões encefálicas, sobretudo na substância branca, e está relacionada com déficits motores e cognitivos (Burd e col., 2012). O aumento de citocinas pró-inflamatórias, a ativação microglial e astrogliar e o prejuízo da maturação dos oligodendrócitos são algumas consequências da inflamação pré-natal e culminam em mielinização deficiente e aumento da vulnerabilidade do encéfalo imaturo aos demais insultos perinatais, como a hipóxia-isquemia (Coumans e col., 2003; Volpe e col., 2011).

A asfixia perinatal também é outro fator que leva a mortalidade neonatal e dano irreversível ao encéfalo (de Haan e col.2006; Morales e col., 2009). A asfixia severa pode levar a deficiências graves como a PC, e epilepsia, enquanto - episódios de asfixia moderada podem provocar disfunções cognitivas (Calamandrei e col., 2004). Esse evento agressor leva a perda neuronal em determinadas áreas encefálicas como o córtex cerebral e estriado (Dell'Anna e col., 1997; Kohlhauser e col., 1999; Van de Berg e col.,2000). Uma combinação entre inflamação gestacional e asfixia perinatal eleva em 70% o risco de desenvolvimento de PC (Coumans e col., 2003).

Os modelos animais de PC são tão heterogêneos quanto a própria doença em si (Johnston e col., 2006) variando entre o tipo de intervenção e espécie animal

utilizada. Conforme os protocolos empregados, diferentes características da PC são reproduzidas em cada modelo e, portanto, os modelos animais são complementares. Porém, é necessário estabelecer um modelo animal para essa patologia que reproduza um maior número de características observadas na clínica.

Estudos experimentais têm mostrado que a pré-exposição ao lipopolissacarídeo (LPS), um dos componentes da membrana exterior de bactérias gram-negativas considerada uma endotoxina que provoca forte resposta imunológica, aumenta a vulnerabilidade do encéfalo imaturo à hipóxia-isquemia (HI) (Larouche e col., 2005; Wang e col., 2008; Girard e col., 2008). A indução de uma resposta inflamatória pela exposição de ratas prenhes à injeção intraperitoneal de LPS no período embrionário, combinada a HI 24 h após o parto, causou déficits motores e lesões corticais e subcorticais mais extensas em comparação aqueles causados pelos mesmos procedimentos isoladamente (Girard e col., 2009). Vários estudos têm procurado associar agressores a fim de causar efeitos deletérios sinérgicos e então produzir um fenótipo mais aproximado da PC (Strata e col., 2004, Girard e col., 2009). Não foram encontrados estudos sobre os efeitos da associação de exposição ao LPS em período embrionário e a asfixia intrauterina em ratos, o que poderia simular de maneira mais adequada o que acontece na clínica. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi analisar se a associação entre a inflamação pré-natal induzida por LPS e asfixia intrauterina reproduz em ratos o fenótipo observado em portadores de PC.

2. RESULTADOS

Filhotes machos e fêmeas de todos os grupos experimentais foram avaliados em todos os testes. Os dados foram submetidos à análise estatística ANOVA multifatorial seguida pelo teste post hoc de Tukey com nível de significância de $p < 0,05$ para avaliar se havia diferença de respostas nos testes entre os gêneros. Como não houve diferença significativa na comparação entre os sexos em todos os testes, filhotes machos e fêmeas compuseram os grupos experimentais.

2.1. Ganho de peso corporal, desenvolvimento motor e cognitivo

Em relação ao peso corporal, a ANOVA de 2 vias para medidas repetidas revelou efeito significativo dos fatores *LPS* ($F(1, 42) = 29,97$; $P < 0,001$); *asfixia* ($F(1, 42) = 9,23$; $P = 0,004$); *tempo* ($F(12, 504) = 3194,78$; $P < 0,001$); porém a interação *LPS* x *asfixia* x *tempo* não foi significativa ($F(12, 504) = 0,97$; $P > 0,05$). Os grupos submetidos às injeções de *LPS* (*LPS* e *LA*) tiveram peso menor que os outros grupos durante as primeiras duas semanas de vida. Aos 30 dias de vida, o fator *LPS* continuou interferindo no ganho de peso corporal dos animais, ANOVA de duas vias, *LPS* ($F(1, 33) = 15,437$; $P < 0,001$); mas o fator *asfixia* foi não significativo ($F(1, 33) = 0,356$; $P > 0,05$); bem como a interação *LPS* x *asfixia* ($F(1, 33) = 2,087$; $P > 0,05$); Figuras 7 e 8).

Quanto ao desenvolvimento motor, somente o fator *LPS* alterou a aquisição dos marcos do desenvolvimento, onde a ANOVA de duas vias revelou um $F(1, 41) = 9,1944$; $P = 0,004$ para a preensão do membro anterior; $F(1, 41) = 5,2766$; $P = 0,03$ para a colocação do membro posterior; $F(1, 41) = 7,48$; $P < 0,01$ para a resposta de sobressalto. A exposição ao *LPS*, associado ou não à *asfixia*, retardou a aquisição da resposta de colocação do membro posterior e da resposta de sobressalto, e ainda, acelerou o aparecimento do reflexo de preensão palmar. Os demais reflexos não foram alterados por nenhum dos fatores em estudo (Tabela 2).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto aos seus desempenhos nos testes de rotarod e suspensão na barra (figuras 9 e 10), e ainda, a distância percorrida no *sample* e *test trial* durante o teste de

objeto reposicionado foi similar entre os diferentes grupos (Tabela 3). No teste de objeto reposicionado, também não foi verificada diferença significativa na exploração do objeto reposicionado no *sample* e *test trial* (figura 11), o que demonstra que intervenções aplicadas de forma isolada ou em conjunto não provocam déficit de memória espacial.

3. DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo desenvolvido visando verificar os efeitos da combinação da inflamação pré-natal induzida por LPS com asfixia intrauterina sobre aspectos motores e cognitivos, na tentativa de compor um modelo animal que reproduzisse o fenótipo da PC. Verificamos que somente o fator LPS (isolado ou em associação à asfixia) afetou o ganho de peso corporal e alterou o dia de aquisição de três marcos do desenvolvimento, retardando a aquisição das respostas de sobressalto e de colocação do membro posterior e adiantando a resposta de preensão palmar. Entretanto, nas demais avaliações, motoras e cognitivas realizadas no P29, não houve diferenças entre os grupos estudados, mostrando que nenhuma das intervenções utilizadas foi capaz de provocar déficits motores e de memória significativos nos animais no período avaliado.

Com relação ao ganho de peso corporal há relatos na literatura de que os animais que sofreram inflamação gestacional têm peso corporal menor que os controles apenas nos dois ou três primeiros dias de vida (Toso e col., 2005; Girard e col., 2009). Também foi documentado que a inflamação por LPS - através do colo do útero não altera o aumento do peso corporal dos filhotes até os 21 dias de vida (Poggi e col., 2004). Além disso, o estudo de Chen e col. (2011) demonstrou que o peso de camundongos expostos a inflamação gestacional foi similar ao peso do grupo controle durante todo o período de avaliação, da 3^a à 33^a semana de vida. Quanto à influência da asfixia sobre o desenvolvimento corporal, Kiss e col. (2009) verificaram que o peso dos filhotes asfixiados foi menor em comparação ao dos controles durante os oito primeiros dias de vida e Veronesi e col. (2006) constataram que os animais asfixiados durante 20 min apresentavam peso corporal inferior ao peso dos animais normoxêmicos até os 13^o dia de idade. No entanto, Van de Berg e

col. (2003) não encontraram diferença significativa entre o peso dos filhotes asfixiados e controles nos primeiros três meses de vida, essa diferença foi observada por Strackx e col. (2010) apenas quando os animais tinham seis meses de idade. Entretanto, nossos resultados indicam que o fator LPS, independente da associação com a asfixia, causa um efeito na redução de peso corporal até os primeiros 30 dias de vida, não permitindo a recuperação de peso dos animais.

Em geral, estudos prévios sugerem que a exposição gestacional ao LPS tem efeito prejudicial transitório sobre parâmetros motores. Toso e col. (2005) verificaram que os filhotes expostos ao LPS através do colo do útero no final da gestação tiveram - um atraso no desenvolvimento de alguns reflexos motores - (endireitamento, aversão à queda e abertura dos olhos). Porém, quando esses animais foram avaliados no período adulto, não demonstravam déficits motores nos testes de rotarod e campo aberto. No estudo de Poggi e col. (2005), a inflamação maternal acelerou o desenvolvimento do reflexo de endireitamento, mas seu efeito não foi duradouro a ponto de revelar pior desempenho nos testes do rotarod e campo aberto. Rousset e col. (2013) verificaram atraso no desenvolvimento do reflexo de endireitamento, na atividade motora e déficit de coordenação motora apenas nos primeiros 20 dias de vida dos filhotes expostos ao LPS no período gestacional, porém não detectaram déficit motor em nenhum período de avaliação com o teste de rotarod.

O efeito que a inflamação maternal exerce sobre o desenvolvimento motor não está bem elucidado, uma vez que há uma divergência dos dados da literatura quanto aos tipos de reflexos alterados e se sua manifestação é acelerada ou retardada. Todavia, existem indicações de que essa inflamação pode perturbar o desenvolvimento do sistema motor. Essa alteração pode ser justificada parcialmente pelo dano a substância branca encefálica, sobretudo a cápsula interna que conecta o córtex cerebral ao tálamo e aos núcleos da base. Associado a isso, foi demonstrado que a inflamação sistêmica em camundongos neonatos provocou redução do diâmetro dos axônios e da espessura da bainha de mielina (Favrais e col., 2011, Rousset e col., 2013). Entretanto, estudos relatam que os déficits motores provocados pela inflamação maternal são revertidos com o passar do tempo. Tal recuperação motora pode ser explicada por mecanismos de plasticidade que ocorrem aproximadamente na segunda semana de vida dos roedores, período que coincide com o desenvolvimento dos axônios do trato corticoespinal. De acordo com

essa hipótese, estudos prévios mostram que no P7 há uma hipomielinização do encéfalo exposto ao LPS, mas na idade adulta apresenta mielinização normal. Sugere-se que a mielinização do encéfalo no início do desenvolvimento não é alterada pela morte de oligodendrócitos induzida pela exposição ao LPS, mas é apenas atrasada pelo insulto (Rousset e col., 2013).

No que se refere à asfixia, da mesma maneira que à exposição ao LPS, os déficits motores foram sutis e transitórios. Kiss e col. (2009) relatam que todos os reflexos e marcos do desenvolvimento avaliados em filhotes submetidos a 15 min de asfixia intra-útero foram retardados e que esses filhotes demandavam significativamente mais tempo para realizar as tarefas de geotáxis negativo, reflexo de endireitamento e atividade motora em relação ao grupo controle. Contudo, até o final do período de avaliação (P21), o desempenho dos animais submetidos à asfixia tornou-se similar aos dos controles. Após expor os animais a diferentes durações de asfixia Hoeger e col. (2000) observaram os marcos do desenvolvimento motor dos diferentes grupos através de uma bateria de testes, a saber: geotáxis negativo, aversão a queda, endireitamento, sobressalto auditivo, colocação dos membros anteriores, colocação baseada na visão, endireitamento em queda livre, *vestibular drop*, travessia de caminho estreito e ascensão de escada. Esse estudo não encontrou diferença significativa no dia de apresentação de resposta em nenhum dos marcos do desenvolvimento avaliados, entre os grupos submetidos a diferentes graus de asfixia e os animais normoxêmicos, o que está de acordo com os nossos resultados.

Segundo estudos prévios, o encéfalo de roedores neonatos é menos suscetível a privação de oxigênio. Além disso, o tempo de asfixia, bem como o grau de maturidade do encéfalo no momento da injúria, são fatores determinantes para a evolução da lesão no SNC (Davis, 1979, Vanucci e col., 1980). O encéfalo neonatal ainda está em processo de maturação e podem ocorrer mecanismos de adaptação a injúrias nesse período. A literatura trás relatos a respeito de diversas lesões provocadas no período neonatal de roedores que foram recuperadas por mecanismos plásticos. Por exemplo, Castro (1975) e Hoeger e col., (2000) mostraram o desenvolvimento de projeções compensatórias do trato corticoespinal de ratos neonatos com lesões extensas.

Além disso, os filhotes asfixiados emitem mais ultravocalizações do que um filhote normoxêmico (Veronesi e col., 2006). As ultravocalizações são um potente

estimulante do cuidado maternal. Logo, a maior demanda por cuidado materno pelos animais asfixiados pode explicar em parte a não instalação de déficits motores, pois possivelmente as mães estimulam mais os filhotes. Essa maior estimulação sensorial e proprioceptiva pode ter compensando os déficits motores. Mais estudos são necessários para elucidar esse aspecto. Estudos que avaliaram o efeito isolado da asfixia intrauterina sobre a motricidade na fase juvenil, também não observaram déficit de coordenação motora no teste de rotarod, nem na locomoção espontânea durante o teste de campo aberto (Hoeger e col., 2000; Kiss et al, 2009).

No estudo de Strackx e col. (2010) foi verificado que os animais expostos a asfixia intrauterina durante 19 min tiveram sua atividade locomotora reduzida em comparação com o grupo controle aos 6 meses de vida, portanto adultos. Segundo Hoeger e col. (2006), os animais submetidos a 20 min de asfixia intrauterina possuíam um déficit de coordenação e equilíbrio no teste de rotarod aos 3 meses de idade. O protocolo de asfixia intrauterina utilizado em nosso estudo é considerado de grau moderado e não alterou os parâmetros motores avaliados, diferentemente dos estudos que utilizam asfixia severa (19 a 20 min). Porém nesses estudos as avaliações foram realizadas em períodos mais tardios, indicando que os déficits podem aparecer mais tardiamente, na idade adulta.

No presente estudo, também analisamos a memória espacial dependente de hipocampo utilizando o teste de objeto reposicionado, no qual não foi observado déficit de memória em nenhum dos grupos experimentais. Embora a porcentagem de exploração do objeto reposicionado do grupo controle tenha sido aparentemente baixa para animais que não foram expostos a nenhuma intervenção, há estudos que também verificaram com o mesmo teste de memória, baixa exploração por parte de animais controle, entretanto, o tempo despendido na exploração do objeto reposicionado pelos controles ainda era maior que os grupos submetidos a insultos (Senna e col., 2011).

Strackx e col. (2010) observaram um déficit de memória em ratos expostos a asfixia intrauterina de 19 min no teste de reconhecimento de objetos aos seis meses de idade. Van de Berg e col. (2000) não verificaram déficit de memória espacial no teste do labirinto aquático, mesmo expondo os animais a uma asfixia intrauterina de 20 min. Hoeger e col. (2000) avaliaram o desempenho no labirinto aquático e labirinto múltiplo (*Multiple Maze*) de ratos submetidos a diferentes períodos de asfixia intrauterina durante 5, 10, 15 e 20 min e não verificaram déficit de memória

espacial em nenhum dos protocolos de asfixia. Simola e col., (2008) avaliou a memória espacial de curta duração através do teste do labirinto em Y (*Y maze*), a memória espacial de longa duração no labirinto de Barnes (*Barnes maze*) e ainda analisou a memória não espacial de trabalho com o teste de reconhecimento de objetos. Neste estudo, os animais expostos a asfixia intrauterina de 20 min apresentaram pior desempenho apenas no teste de reconhecimento de objetos. Com o mesmo protocolo de asfixia utilizado por Simola e col., (2008) e Morales e col., (2009) também observaram um pior desempenho no teste de reconhecimento de objetos, mas não no teste de *do labirinto em Y* nos animais asfixiados.

Esses achados sugerem que a asfixia intrauterina, independentemente do grau de severidade, tem ação deletéria específica sobre a memória não-espacial. Embora sejam interconectados, os circuitos neurais responsáveis pelo processamento da memória espacial são diferentes dos que processam a memória não-espacial. A memória não-espacial é processada por uma via que envolve áreas corticais associativas, tálamo medial e outras áreas subcorticais, enquanto que a espacial depende de uma circuitaria que conecta o hipocampo, córtex pré- límbico, córtex parietal anteromedial e posterior (Steckler e col.1998, Simola e col., 2008). Embora ambas as vias sejam danificadas pela asfixia intrauterina (Bjelke e col.1991; Kohlhauser e col.1999, Simola e col., 2008), provavelmente a via envolvida com a memória espacial pode ser menos sensível a injúria provocada pela asfixia ou pode haver mecanismos compensatórios que justifiquem a funcionalidade dessa via após o insulto (Simola e col., 2007).

Há poucos trabalhos na literatura que descrevem o efeito da inflamação perinatal por LPS sobre a memória. Entretanto, Chen e col. (2011) verificaram que a administração de LPS no final da gestação de camundongas CD-1 não teve efeito deletério sobre a memória espacial e não espacial dos filhotes aos 35 dias de vida, efeito que se manifestou apenas quando os animais tinham 400 dias. Wang e col. (2009) também estudaram os efeitos da inflamação pré-natal por LPS e verificaram déficit de memória espacial a partir de 400 dias em camundongos CD-1. Portanto, a inflamação pré-natal por LPS não causa danos imediatos sobre a memória espacial e não espacial, (Chen e col., 2011).

Poucos estudos combinaram injeções de LPS no período pré-natal e algum protocolo de asfixia. Os estudos que combinam inflamação a privação de oxigênio no período perinatal, utilizaram protocolos de H/I (24 h após o parto; Girard e col.,

2009) e anóxia (no dia do parto, Stigger e col., 2013). No primeiro estudo foi constatado que os animais submetidos à inflamação gestacional e H/I apresentaram pior desempenho nos testes de campo aberto do P15 ao P25 e no rotarod do P30 ao P40. No segundo também foi constatado que no P29, os animais expostos a inflamação por LPS e anóxia perinatal possuíam déficit de equilíbrio e coordenação motora evidenciada na tarefa de rotarod. Não foram encontrados estudos que avaliassem o efeito da associação da inflamação gestacional e asfixia neonatal sobre a memória espacial.

Comparado a esses estudos, as alterações provocadas pelo nosso modelo experimental são sutis e efêmeras, restringindo-se ao período neonatal, contrariamente ao que ocorre na clínica, onde os déficits motores são permanentes. A recuperação dos roedores após esses insultos pode ser explicada pelo fato de seus encéfalos serem mais primitivos, menos complexos que o humano e por isso mais plásticos (Rousset e col., 2013). Além disso, a organização e as atribuições do trato córtico-espinhal dos roedores diferem dos humanos, o que pode justificar o fato de lesões encefálicas não repercutirem em déficits funcionais tão severos (Eyre, 2007). Entretanto, é necessário continuar testando diferentes agressores a fim de estabelecer um modelo animal de PC em ratos. Tal necessidade baseia-se no fato de que essa espécie é de fácil manejo, reproduz-se e matura muito rapidamente (Rooney e col., 1997, Rice, Barone, 2000), e é possível avaliar diversos tipos de comportamentos que em outras espécies seriam inviáveis.

É necessário continuar estudando novas estratégias experimentais que possam reproduzir o fenótipo da paralisia cerebral em ratos, pois somente um modelo animal fidedigno a patologia é capaz de fornecer informações relevantes sobre a base biológica do distúrbio e torna-se verdadeiramente útil para elaboração de intervenções preventivas e terapêuticas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Indução do Modelo Animal de PC

Todos os procedimentos desse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da UFRGS (18450). Os animais, ratos Wistar machos e fêmeas provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL/UFRGS), foram mantidos em um ambiente com temperatura controlada (20 ± 2 °C), ciclo claro/escuro de 12 horas, com água e comida *ad libitum*, conforme a Lei nº 6638 de 8/5/79 que regulamenta o uso de animais para prática didático-científica.

A inflamação pré-natal foi induzida conforme descrito por Girard et al., (2009) no 17º dia de gestação: metade das ratas prenhes receberam injeções via i.p. de LPS (Sigma, EUA) na dose de 200 µg/kg diluído em 100 µl de salina, enquanto as ratas remanescentes recebiam somente o veículo (100 µl de salina) de 12 em 12 h até o 21º dia de gestação (E21).

No E22, as ratas foram eutanasiadas e seus cornos uterinos foram separados através de uma histerectomia (Bjelke e col.1991; Yang e col.2011; Souza e col., 2013). Um dos cornos uterinos contendo os filhotes foi clampeado em suas extremidades e transferido para uma solução salina a 37°C onde permaneceu durante 15 min (neonatos asfixiados), enquanto que o outro corno uterino foi imediatamente aberto, obtendo-se os neonatos controle (Figura 5). Após a histerectomia, todos os filhotes foram removidos, limpos, tiveram seus cordões umbilicais clampeados e permaneceram a temperatura ambiente durante 60 min para que se recuperassem do procedimento antes de serem entregues a uma mãe substituta, que havia parido no máximo cinco dias antes de recebê-los. Os neonatos experimentais eram, então, misturados com os filhotes biológicos das mães substitutas, na ausência da mesma, durante aproximadamente 15 min para que adquirissem o odor da ninhada biológica que era destinada nesse momento, a outro estudo. Os animais permaneciam aos cuidados da mãe substituta até o P21, período no qual eram desmamados. Cada ninhada possuía de 5 a 8 animais. Sendo assim, os grupos experimentais são: ratos submetidos à injeção de salina e cesariana (CT); ratos submetidos à injeção de LPS e cesariana (LPS); ratos submetidos à injeção

de salina e à asfixia intrauterina (A); ratos submetidos à injeção de LPS e à asfixia intrauterina (LA).

4.2. Análises Funcionais

4.2.1. Pesagem e marcos do desenvolvimento Motor

O peso dos animais foi registrado do P1 ao P14, período em que eles se alimentam apenas do leite materno, no intuito de obter um indicativo indireto de seu desenvolvimento, aos 30 dias de vida, o peso dos animais foi novamente registrado.

A bateria de testes dos Marcos do Desenvolvimento foi realizada, diariamente, conforme Marcuzzo e col. (2009), entre o P3 e o P14. Os animais foram submetidos às seguintes tarefas: 1) endireitamento – capacidade do filhote, posicionado em supino, voltar à posição de pronação; 2) geotáxis negativo – capacidade do filhote, posicionado em uma superfície inclinada em 45° de cabeça para baixo, virar-se e escalar; 3) aversão a queda - habilidade do filhote, posicionado com os membros anteriores para fora de uma superfície, esquivar-se; 4) preensão do membro anterior – habilidade do filhote segurar-se com seus membros anteriores por pelo menos 1 segundo em um cabo localizado a 15 cm da superfície; 5) sobressalto – salto involuntário do filhote em resposta ao barulho de um objeto de metálico lançado sobre uma superfície há 10 cm do animal; 6) abertura dos olhos; 7) colocação do membro posterior – reflexo de colocação do membro posterior em resposta ao estiramento proprioceptivo; 8) atividade motora – o filhote deve sair de um círculo de 13 cm de diâmetro. O tempo limite de 30 segundos foi utilizado para realização de cada tarefa. Foi registrado o dia em que a resposta esperada foi apresentada e o teste não era mais repetido nos dias subsequentes.

4.2.2. Avaliação motora e cognitiva

No P29 foram realizados o teste de objeto reposicionado, suspensão na barra e Rota Rod conforme figura 2 . O teste de objeto reposicionado avalia a memória espacial e consiste em um aparato de campo aberto (40x 34x 25cm), dividido em 9 quadrados iguais, no qual há dois objetos iguais em determinadas posições (*sample trial*). O animal é colocado nesta caixa durante 5 min para que explore os objetos e após um intervalo de 50 min, ele retorna ao aparato e permanece nele por mais 5 min, no entanto, a posição de um dos objetos dentro do campo aberto é alterada (*test trial*). No dia anterior ao teste, P28, os animais foram colocados, individualmente, no campo aberto, sem os objetos, durante 3 min para que o explorassem e se adaptassem ao aparato. A caixa de campo aberto e os objetos eram higienizados com etanol a 70% a cada tentativa dos animais para remover possíveis odores. Ambos os *trials* foram filmados e analisados quanto a parâmetros locomotores que incluíram a distância total percorrida (contagem dos quadrados nos quais o animal se locomovia) e tempo despendido explorando os objetos. É considerada exploração, o contato físico do animal com o objeto pelo focinho, patas dianteiras ou vibrissas (tendo a cabeça direcionada ao objeto). A resposta fisiológica desse teste é caracterizada pela maior exploração do objeto reposicionado ou pela igual exploração dos dois objetos no *test trial* (Revsin e col., 2009). O cálculo da porcentagem de exploração do objeto reposicionado foi realizado conforme Revsin e col., 2009: $\text{exploração do objeto reposicionado (s) / exploração de ambos os objetos (s) X100}$.

O teste de suspensão na barra serve para avaliar a força muscular e a coordenação. O animal era estimulado a permanecer suspenso pelos membros anteriores em uma barra de 5 milímetros de diâmetro e elevada a 1 m da superfície durante 1min. O parâmetro avaliado foi a latência de queda.

O desempenho do animal no rotarod avalia o equilíbrio e a coordenação motora. Neste teste, o animal é colocado sobre uma haste texturizada de 60 mm de diâmetro e 75 mm de comprimento, em rotação, a uma velocidade de 30 rpm. Os animais permaneciam no rotarod no máximo 3 min, sendo registrada a latência de queda. No dia seguinte às avaliações funcionais, os animais foram eutanasiados por perfusão transcardíaca para posterior análise histológica de seus encéfalos.

4.3. Análise Estatística

Os dados são expressos como média \pm SEM. O acompanhamento do peso dos animais no período de P1 a P14 foi submetido a ANOVA de duas vias de medidas repetidas. As demais avaliações foram analisadas pela ANOVA de duas vias. Ambos os testes foram seguidos pelo teste *post-hoc* de Tukey quando apropriado. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os dados foram analisados através do software Statistica versão 6.0.

Agradecimento

Este trabalho foi financiado pela agência de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

Bax, M., Goldstein, M., Rosenbaum, P. 2005. Proposed definition and classification of cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 47, 571–6.

Berger R, Bender S, Sefkow S, Klingmüller V, Künzel W, Jensen A. 1997. Peri/intraventricular haemorrhage: a cranial ultrasound study on 5286 neonates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Bio.* 75, 191-203. Bjelke, B., Andersson, K., Ogren, S.O.

Bolme, P. 1991. Asphyctic lesion: proliferation of tyrosine hydroxylase-immunoreactive nerve cell bodies in the rat substantia nigra and functional changes in dopamine neurotransmission. *Brain Res* 543,1–9.

Blair, E., Watson, L. Epidemiology of cerebral palsy. 2005. *Semin Fetal Neonatal Med.* 11, 117-125.

Burd, I. Balakrishnan, B., Kannan, S. *American Journal of Reproductive Immunology.* 2012. Models of Fetal Brain Injury, Intrauterine Inflammation, and Preterm Birth. 67, 287-295.

Calamandrei, G., Veronesi, A. P. , Valanzano, A., De Bernardinis, M. A., Greco, A., Puopolo, M., Minghetti, L. 2004. Increased Brain Levels of F2-Isoprostane Are an Early Marker of Behavioral Sequels in a Rat Model of Global Perinatal Asphyxia. *Pediatric Research*. 55, 85-92.

Castro, A.J.. 1975. Ipsilateral corticospinal projections after large lesions of the cerebral hemisphere in neonatal rats. *Exp. Neurol*. 46 1-8.

Chen, G., Wang, H., Yang, Q. , Tao, F., Wang, C., Xu, D. 2011. Acceleration of age-related learning and memory decline in middle-aged CD-1mice due to maternal exposure to lipopolysaccharide during late pregnancy. *Behavioural Brain Research*. 218, 267-279.

Coumans, A.B., Middelani, J.S., Garnier, Y., Vaihinger, H.M., Leib, S.L., Von Duering, M.U., Hasaart, T.H., Jensen, A., Berger, R. 2003. Intracisternal application of endotoxin enhances the susceptibility to subsequent hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Pediatr Res* 53, 770–775.

de Haan M., Wyatt, J.S., Roth, S., Vargha-Khadem, F., Gadian, D., Mishkin, M. Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. 2006. *Dev Sci*. 9, 350-8.

Davis, J.N.. 1979. The use of small animals to study the effects of hypoxia. *Adv. Neurol*. 26,167-172.

Fairhurst, C. 2012. Cerebral Palsy: the whys and hows. *Arch Dis Child Educ Pract*. 97:122-131.

Favrais, G., van de Looij Y., Fleiss, B., Ramanantsoa, N., Bonnin, P., Stoltenburg-Didinger, G., Lacaud, A., Saliba, E., Dammann, O., Gallego, J., Sizonenko, S., Hagberg, H., Lelievre, V., Gressens. 2011. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann Neurol.* 70, 550–565.

Folkerth, R.D. Neuropathologic substrate of cerebral palsy. 2005. *J Child Neurol.* 20, 940-949.

Girard, S., Larouche, A., Kadhim, H., Rola-Pleszczynski, M., Gobeil, F., Sebire, G. 2008. Lipopolysaccharide and hypoxia/ischemia induced IL-2 expression by microglia in neonatal brain. *Neuroreport* 19, 997–1002.

Girard, S., Kadhim, H., Beaudet, N., Sarret, P., Sébire, G. 2009. Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: A novel animal model for cerebral palsy. *Neuroscience.* 23, 673-82.

Hoeger , H., Engelmann M., Bernert, G., Seidl, R., Bubna-Lit&z, H., Mosgoeller , W., Lubec , B., Lubec, G.. 2000. Long Term Neurological and Behavioral Effects of Graded Perinatal Asphyxia in the rat. *Life Sciences.* 66, 947-962.

Hoeger, H., Engidawork, E., Stolzlechner, D., Bubna-Littitz, H., Lubec., B. .2006.Long-term effect of moderate and profound hypothermia on morphology, neurological, cognitive and behavioural functions in a rat model of perinatal asphyxia. *Amino Acids.* 31,385–396.

Johston, M.V., Hoon, A.H. 2006.Jr. Cerebral Palsy. *Neuromolecular Med.*, 8, 435-440.

Kadhim, H., Sebire, G., Kahn, A., Evrard, E., DAN, B. 2005. Causal mechanisms underlying periventricular leucomalacia and cerebral palsy. *Current Pediatric Reviews*. 1, 1-6.

Kiss, P., Szogyi, D., Reglodi, D., Horvath, G. , Farkas, J. , Lubics, A., Tamasa, Atlasz, A. T., Szabadfib, K., Babai, N., Gabriel, R. , Koppan, M.. 2009. Effects of perinatal asphyxia on the neurobehavioral and retinal development of newborn rats. *Brain Research*.1255, 42-50.

Kohlhauser, C., Mosgoeller, W., Hoeger, H., Lubec, G., Lubec, B. 1999. Cholinergic, monoaminergic and glutamatergic changes following perinatal asphyxia in the rat. *Cell Mol Life Sci*. 55, 1491–1501.

Krigger, K.W. Cerebral palsy na overview. 2006. *Am Fam Physician*. 73, 91-100.

Larouche, A., Roy, M., Kadhim, H., Tsanaclis, A.M., Fortin, D., Sebire, G. 2005. Neuronal injuries induced by perinatal hypoxic-ischemic insults are potentiated by prenatal exposure to lipopolysaccharide: animal model for perinatally acquired encephalopathy. *Dev Neurosci* 27, 134–142.

Marcuzzo, S. Dutra, M.F., Stigger, F., do Nascimento, P.S. Ilha, J.; Kalil-Gaspar, P.I.; Achaval, M. 2009. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. *Brain Dev*. in press.

Marlow, N., Rose, A.S., Rands, C.E., Drapper, E.S. 2005. Neuropsychological and educational problems at school age associated with neonatal encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. 90, 380-387.

Morales, P., Simola, N., Bustamante, D., Lisboa, F., Fiedler, J., Gebicke-Haerter, P. J., Morelli, M., Tasker, R. A., Herrera-Marschitz, M. 2010. *Exp Brain Res.* 202,1–14.

Poggi, S. H., Park, J., Toso, L., Abebe, D., Roberson, R., Woodard, J. E., Spong, C.Y. 2005. No phenotype associated with established lipopolysaccharide model for cerebral palsy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 192, 727-733.

Revsin, Y., Rekers, N., Louwe, M., Saravia, F., Nicola, A., Kloet, E., Oitz, M. 2009. Glucocorticoid Receptor Blockade Normalizes Hippocampal Alterations and Cognitive Impairment in Streptozotocin- Induced Type 1 Diabetes Mice. *Neuropsychopharmacology.* 136, 1–12.

Rice D., Barone, S. 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system evidence from humans and animals models. *Environ Health Perspect.* 108 511-33.

Rooney, T., Raju, T.N., Monstogiannis, A.N. 1997. Animal models for the study of perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy a critical analysis. *Early Hum Dev.* 47, 115-46.

Rousset, C. I., Kassem, J., Aubert, A., Planchenault, D., Gressens, P. Chalon, S., Belzung, C., Saliba, E. 2013. Maternal Exposure to Lipopolysaccharide Leads to Transient Motor Dysfunction in Neonatal Rats *Dev Neurosci.*

Senna, P.N., Ilha, J., Baptista, P.P., do Nascimento, P.S., Leite, M.C., Paim, M.F., Gonçalves, C.A., Achaval, M., Xavier, L.L. 2011. Effects of physical exercise on spatial memory and astroglial alterations in the hippocampus of diabetic rats. *Metab Brain Dis.* 26: 269–279.

Simola, N., Bustamante, D., Pinna, A., Pontis, S., Morales, P., Morelli, M., Herrera-Marschitz, M. 2008. Acute perinatal asphyxia impairs non-spatial memory and alters motor coordination in adult male rats. *Exp Brain Res.* 185, 595–601.

Steckler, T., Drinkenburg, W.H., Sahgal, A., Aggleton, J.P. (1998) Recognition memory in rats—II. Neuroanatomical substrates. *Prog Neurobiol* 54, 313–332.

Stigger, F., Lovatel G., Marques, M., Bertoldic, K., Moysés, F., Elsnerc, V., Siqueira, I. R., Achaval, M., Marcuzzo, S. 2013. Inflammatory response and oxidative stress in developing rat brain and its consequences on motor behavior following maternal administration of LPS and perinatal anoxia. Submitted.

Strackx, E., Van den Hove, D. L.A., Prickaerts, J., Zimmerman, Steinbusch, L. H. W.M., Blanco, C. E., Gavilanes, A.W. D., Vles, J.S.H. 2010. Fetal asphyctic preconditioning protects against perinatal asphyxia-induced behavioral consequences in adulthood. *Behav. Brain Res.* 208, 343-351.

Strata, F., Coq, J.O., Byl, N., Merzenich, M.M. 2004. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: implications for a rodent model of cerebral palsy. *Neuroscience* 129, 141-156.

Souza, S. K., Martins, T. L., Ferreira, G. D., Vinagre, A. S., Silva, R. S. M., Frizzo, M. E. 2013. Metabolic effects of perinatal asphyxia in the rat cerebral cortex. *Metabolic Brain Disease.*

Toso, L., Poggi, S., Park, J., Einat, H., Roberson, R., Dunlap, V., Woodard, J. Abebe, D.I, Spong, C.Y.. 2005. *Brain & Development. American Journal of Obstetrics*

and Gynecology. Inflammatory-mediated model of cerebral palsy with developmental sequelae. 41, 193-933.

Vannucci, S.J., Vannucci, R.C. J. 1980. Glycogen metabolism in neonatal rat brain during anoxia and recovery. *Neurochem* 34, 1100-1105.

Van de Berg, W.D.J., Blokland, A., Cuello, A.C., Schmitz, C., Vreuls, W., Steinbusch, H.W.M., Blanco, C.E. 2000. Perinatal asphyxia results in changes in presynaptic bouton number in striatum and cerebral cortex- a stereological and behavioral analysis. *J Chem Neuroanatomy* 20, 71-82.

van de Berg, W.D., Kwajtaal, M., de Louw, A.J., Lissone, N.P., Schmitz, C., Faull, R.L., Blokland, A., Blanco, C.E., Steinbusch, H.W., 2003. Impact of perinatal asphyxia on the GABAergic and locomotor system. *Neuroscience* 117, 83–96.

Venerosi, A., Cutuli, D., Chiarotti, F., Calamandrei, G., 2006. Csection birth per se or followed by acute global asphyxia altered emotional behaviour in neonate and adult rats. *Behav. Brain Res.* 168, 56–63.

Wang, X., Hagberg, H., Nie, C., Zhu, C., Ikeda, T., Mallard, C. 2008. Dual role of intrauterine immune challenge on neonatal and adult brain vulnerability to hypoxia-ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* 66, 552–561.

Wu, Y.W., Colford, J.M. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy. 2000. A meta-analysis. *JAMA.* ;848, 1417-24.

Yang, T., Zhuang, L., Terrando, N., Wu, X., Johnson, M.R., Maze, M. Ma, D. 2011. A clinically relevant model of perinatal global ischemic brain damage in rats. *Brain Res* 1383, 317–323.

APÉNDICES

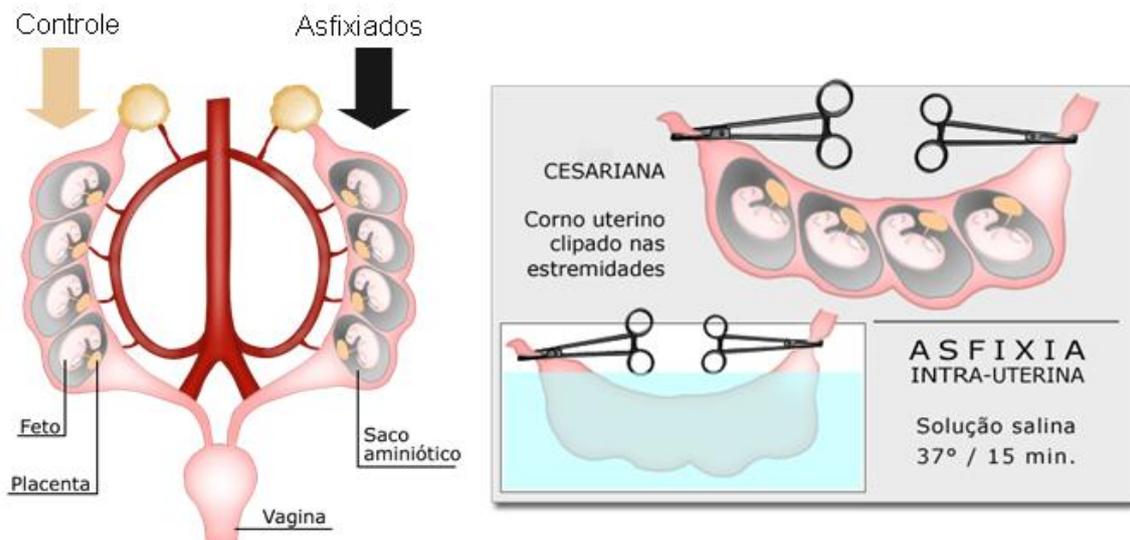


Figura 5. Esquema demonstrando o protocolo de hysterectomia de uma rata no qual se obtém ratos controles de um corno uterino e asfixiados do outro corno uterino.

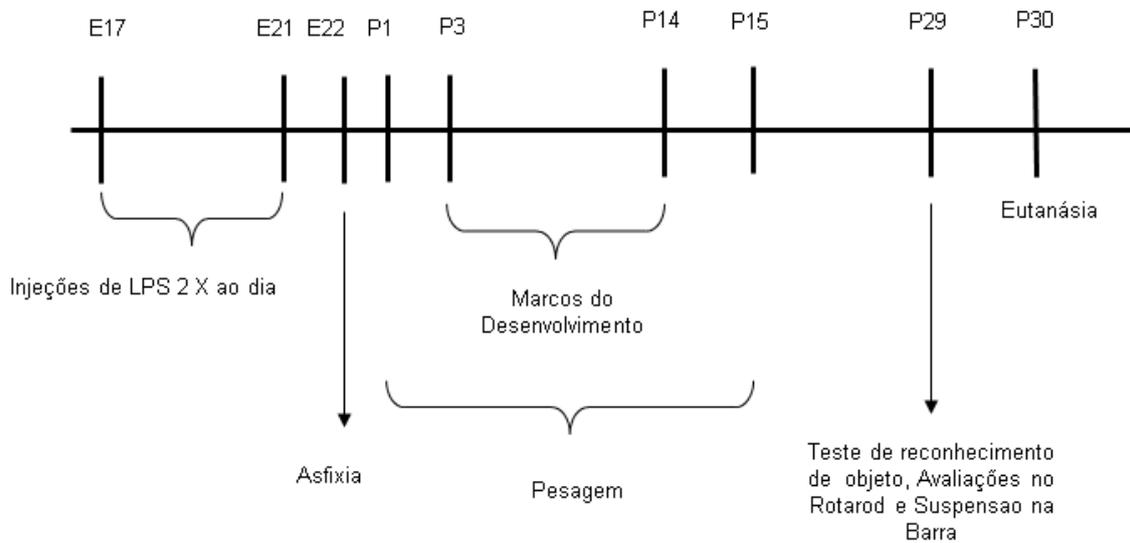


Figura 6. Desenho Experimental.

Tabela 2.. Média (\pm SEM) do dia de manifestação dos sinais físicos e neurológicos dos diferentes grupos.

AVALIAÇÃO	MÉDIA DO DIA DE APRESENTAÇÃO DE RESPOSTA			
	CT (n=9)	A (n=16)	LPS (n=8)	LA (n=12)
Atividade Motora	8,7 \pm 1,3	10,8 \pm 0,8	9,875 \pm 1,2	9,3 \pm 1,0
Abertura dos Olhos	14,7 \pm 0,1	14,8 \pm 0,1	15,0 \pm 0	14,9 \pm 0,08
Colocação do Membro Posterior	4,8 \pm 0,5	5,3 \pm 0,3	7,3 \pm 1,2*	6,2 \pm 0,9*
Preensão Membro Superior	5,0 \pm 0,4	5,1 \pm 0,2	4,0 \pm 0,3*	4,0 \pm 0,2*
Sobressalto	13,4 \pm 0,2	13,5 \pm 0,1	14,0 \pm 0,3*	14,2 \pm 0,2*
Aversão a queda	5,2 \pm 0,3	4,7 \pm 0,3	4,5 \pm 0,2	4,5 \pm 0,1
Endireitamento	3,1 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	3,3 \pm 0,1	3,5 \pm 0,4
Geotaxis negativo	9,6 \pm 0,5	8,3 \pm 0,7	9,1 \pm 0,7	8,3 \pm 0,6

GANHO DE PESO CORPORAL

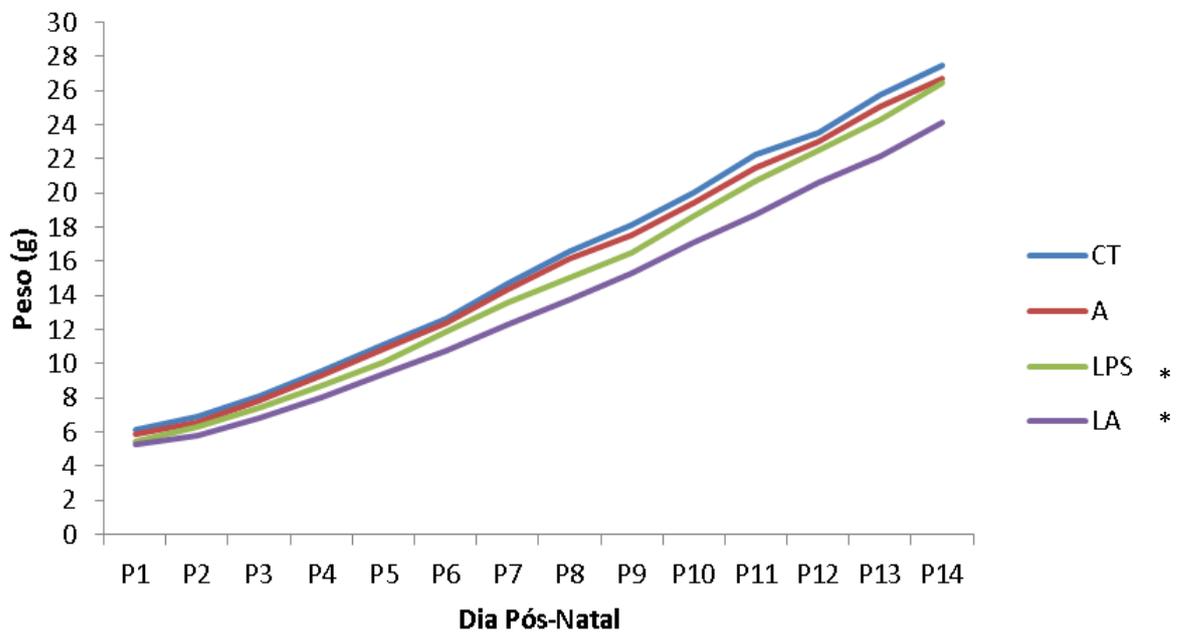


Figura 7. Peso dos animais CT (n=9), A (n=15), LPS (n=8) e LA (n=14) ao longo do período de avaliação (P1 ao P14) dos grupos. ANOVA: LPS (P =0,001).

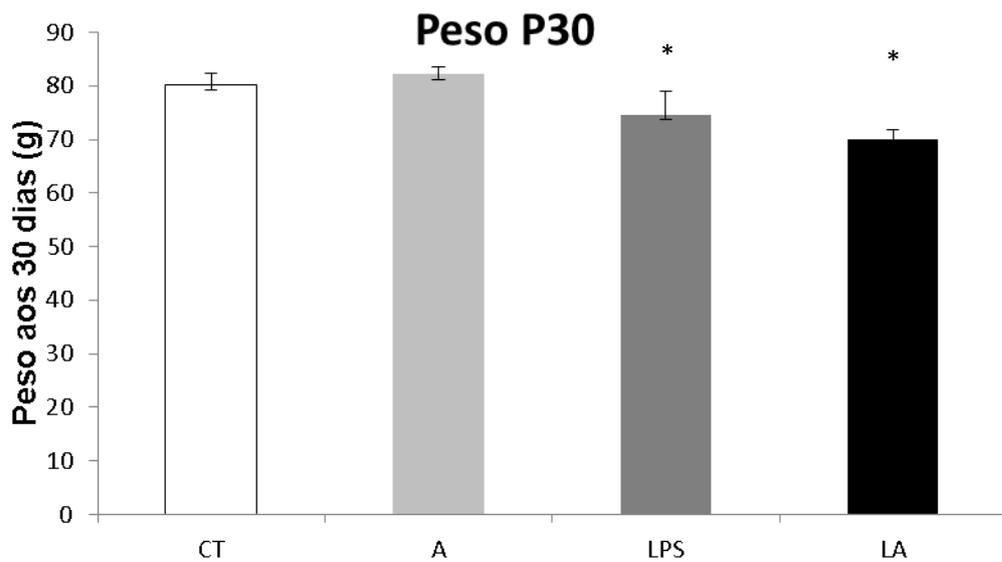


Figura 8. Peso dos grupos CT (n=9), A (n=14), LPS (n=6) e LA (n=8) no P30. Os grupos expostos ao fator LPS continuaram apresentando menor peso corporal em relação aos demais. * $p=0,001$

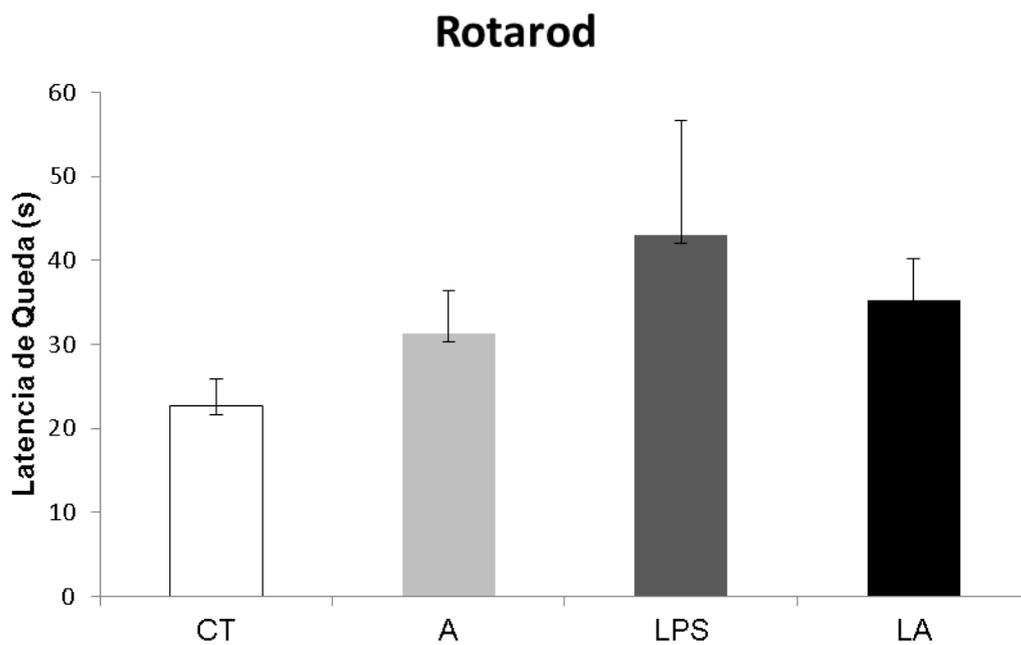


Figura 9. Latência de queda dos grupos CT (n=6), A (n=10), LPS (n=5) e LA (n=10) durante a avaliação no rotarod no P29. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

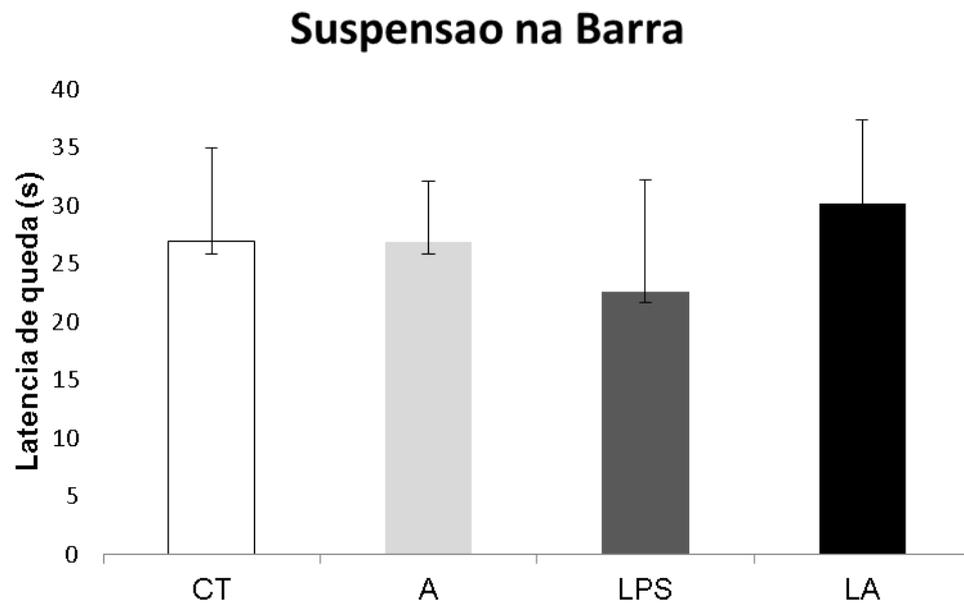


Figura 10. Latência de queda dos grupos CT (n=9), A (n=16), LPS (n=8) e LA (n=14) durante a avaliação no teste de suspensão na barra no P29. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos experimentais.

Tabela 3. Locomoção durante o *sample* e *test trial* do teste de objeto reposicionado. A ANOVA de duas-vias não revelou diferença significativa entre os grupos.

	CT (n=6)	A (n=10)	LPS (n=6)	LA (n=9)
<i>Sample Trial</i>				
Numero de quadrados cruzados	93,5±7,6	105,90±5,7	94,0±5,2	98,7±3,7
<i>Test Trial</i>				
Numero de quadrados cruzados	83,5±6,4	80,4±6,0	76,4±3,8	78,1±2,7

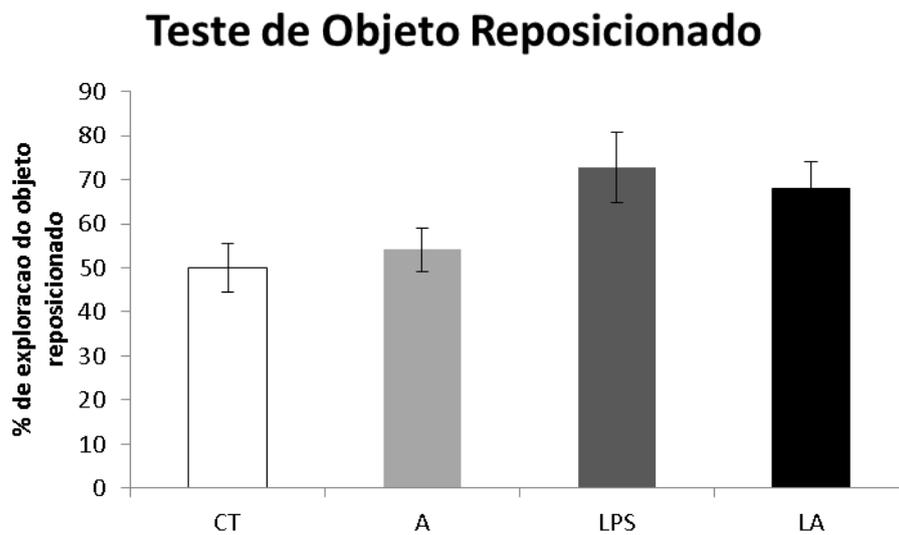


Figura 11. Porcentagem de exploração do objeto reposicionado do grupo CT (n=7), A (n=7), LPS (n=7) e LA (n=10).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo demonstrou que a asfixia intrauterina combinada ou não a inflamação gestacional por LPS não foi capaz de provocar déficits motores permanentes em ratos, como aqueles observados nos portadores de PC. Não foram observados prejuízos na memória espacial. Sendo assim, esse modelo experimental tem efeito específico sobre alguns aspectos do desenvolvimento e não é válido como modelo animal de PC. Os resultados que nos levaram a essa conclusão são os seguintes:

- Os grupos submetidos a inflamação pré-natal tiveram seu peso corporal significativamente menor em relação aos demais grupos durante os seus primeiros 15 dias de vida, padrão que se manteve até um mês de idade;
- Somente os animais expostos ao LPS tiveram alterações na avaliação dos marcos do desenvolvimento, onde as respostas de sobressalto e colocação do membro posterior foram atrasadas e a preensão palmar adiantada em comparação aos demais grupos experimentais;
- Nenhum dos grupos experimentais demonstraram déficit funcional nas tarefas de rotarod e suspensão na barra;
- Os animais não apresentaram déficit motor e cognitivo durante o teste de objeto reposicionado;

Os resultados obtidos até o presente momento compõem somente a parte inicial desse estudo, que continua em andamento. Posteriormente serão realizadas análises histológicas para averiguação da ativação microglial e astrogliar, dano neuronal e aos oligodendrócitos. Essas avaliações histológicas serão propostas para analisar as possíveis alterações morfológicas, ainda que não tenham sido detectadas disfunções motoras.

6. REFERÊNCIAS ADICIONAIS

Ancel P.Y., Livinec F., Larroque,B., Marret ,S., Arnaud, C., Pierrat, V.2006. Cerebral palsy among very preterm children in relation to gestational age and neonatal ultrasound abnormalities: he EPIPAGE Cohort study. *Pediatrics*.117, 828-35.

Badawi, N. Kurinczuk, J.J., Keogh J.M. 1998. Intrapartum risk factors for newborn encephalopathy the Western Australian case-control study. *BMJ*. 317, 1554-1558.

Brasil, Ministério da Saúde/Secretaria de Atenção a Saúde/Departamento de Ações Programáticas e Estratégicas. Diretrizes à Pessoa com Paralisia Cerebral, p. 27, Brasília-DF, 2013.

Cannon, M., Jones, P.B., Murray, R.M., 2002. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *Am. J. Psychiatry* 159, 1080–1092.

Dammann O, Leviton A.1997. Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn. *Pediatr Res*. 42, 1-8

Damman, O., Durum, S. Leviton, A. 2001. Do White cells matter in the white matter damage? *Trends Neurosci*. 24, 320-324.

Dell'Anna, M.E., Calzolari, S., Molinari, M., Iuvone, L., Calimici, R. 1991. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. *Behav. Brain Res.* 45 125-134.

de Haan M., Wyatt J.S., Roth, S., Vargha-Khadem, F., Gadian, D., Mishkin, M. 2006. Brain and cognitive-behavioural development after asphyxia at term birth. *Dev Sci.* 9, 350-8

Derrick, M., Luo, N.L., Bregman, J.C., Jilling, T., Ji, X., Fisher, K. 2004. Preterm fetal hypoxia–ischemia causes hypertonia and motor deficits in the neonatal rabbit: a model for human cerebral palsy? *J Neurosci.* 24, 24-34.

Galeano, P. Calvo, E. B., Oliveira, D. M., Cuenya, L., Kamenetzky, G. V., Mustaca, A. E. , Barreto, G. E. , Alvarez, L. D. G., Milei, J., Capani, F. 2011. Long-lasting effects of perinatal asphyxia on exploration, memory and incentive downshift. *Int. J. Devl Neuroscience.* 29, 609–619.

Gomez, R., Romero, R., Ghezzi, F., Yoon, B.H., Mazon, M., Berry, S.M. 1998. The fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*; 179:194–202.

Gren, L. B.; Hurvitz, E. A. Cerebral Palsy. 2007. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America.* 18: 859-882.

Grether, J.K., Nelson, K.B. 1998. Maternal infection and cerebral palsy in infants of normal birth weight. *JAMA.* 278, 207-211.

Hagberg, B., Hagberg, G., Beckung, E., Uvebrandt, P. 2001. Changing panorama of cerebral palsy in Sweden, VIII: prevalence and origin in the birth year period 1991-94. *Acta Paediatr.* 90, 271-7.

HENDERSON, R. C., Grossberg RI, Matuszewski J, Menon N, Johnson J, Kecskemethy HH, Vogel L, Ravas R, Wyatt M, Bachrach SJ, Stevenson RD. 2007. Growth and nutritional status in residential center versus home-living children and adolescents with quadriplegic cerebral palsy. *Journal of Pediatrics*, Cincinnati, OH,. 151: 161-166.

Hill, A., 1991. Current concepts of hypoxic-ischemic cerebral injury in the term newborn. *Pediatr. Neurol.* 7, 317–325.

Hill, A., Volpe, J.J., 1981. Seizures, hypoxic-ischemic brain injury, and intraventricular hemorrhage in the newborn. *Ann. Neurol.* 10, 109–121.

Hutton, J.I., Cooke, T., Pharoah, P.O.D. 1994. Life expectancy in children with cerebral palsy. *British Medical Journal*, London. 309, 431-435.

Jones, M.W., Morgan, E., Shelton, J.E., Thorogood, C. 2007. Cerebral palsy: introduction and diagnosis (part I). *J Pediatr Health Care.* 21(3):146-52.

Koop, E.B., Medzhitov, R. 1999. The Toll-receptor family and the control of innate immunity. *Current Opin Immunol.* 11, 13-18.

Lance, J.W. What is the spasticity? 1990. *Lancet.* 335, 606.

Levine, S. 1960. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am.J.Pathol.*, 36: 1-17.

Leviton A., Gressens, P. 2007. Neuronal damage accompanies perinatal white-matter damage. *Trends Neurosci* 30, 473–478.

Lieberman, E., Lang, J., Richardson, D.K., Frigolieto, F.D., Heffener L.J., Coehn A. Intrapartum maternal fever and neonatal outcome. *Pediatrics*. 105, 8-13.

Loidl, C.F., Gavilanes, A.W., Van Dijk, E.H., Vreuls, W., Blokland, A., Vles, J.S., Steinbusch, H.W., Blanco, C.E. 2000. Effects of hypothermia and gender on survival and behavior after perinatal asphyxia in rats. *Physiol Behav* 68, 263-269.

Lubec, B., Dell'Anna, E., Fang-Kircher, S., Marx, M., Herrera-Marschitz, M., Lubec, G. 1997. Decrease of brain protein kinase C, protein kinase A, and cyclin-dependent kinase correlating with pH precedes neuronal death in neonatal asphyxia. *J. Investig. Med.* 45, 284–294.

Mclean, C., Ferriero, D. M. 2004. Mechanisms of hypoxic-ischemic injury in the term infant. *Seminars in Perinatology*. 28, 425-432.

Minciu, I. 2012. Clinical Correlations in Cerebral Palsy. *A Journal of Clinical Medicine*. 7, 319-324.

Monteiro, C.B.M. Realidade Virtual na Paralisia Cerebral. *Pleiade*, Cap.25

Nelson K.B., Dambrosia J.M., Grether J.K., Phillips T.M. 1998 Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol*; 44:665–675.

Novacheck, T.F., Gage, J.R. 2007. Orthopedic management of spasticity in cerebral palsy. *Childs Nerv System*. 23, 1015-1031.

Pirila, S. 2011. Executive functions in youth with spastic cerebral palsy. *Journal of child neurology*. 11, 817:821.

Polam, S., Koons, A., Anwar, M., Shen-Schwarz, S., Hegyi, T..2005. Effect of Chorioamnionitis on Neurodevelopmental Outcome in Preterm Infants. American Medical Association. 159,1032-1035.

Reddihough DS, Collins KJ. 2003.The epidemiology and causes of cerebral palsy. Aust J Physiother. 49, 7-12.

Rice, J.E., Vanucci, R.C., Brierley, J.B. 1981. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. Ann. Neurol. 9: 131-141.

Rojas, J. J. , Deniz, B. F., Miguel, P. M. , Diaz, R. É. do Espírito-Santo Hermel, Achaval, M., Netto, C. A.,Pereira, L. O.. 2013. Effects of daily environmental enrichment on behavior and dendritic spine density in hippocampus following neonatal hypoxia–ischemia in the rat. Experimental Neurology. 241, 25-33.

Romero, R., Avila, C., Santhanam, U., Sehgal, P.B. 1990. Amniotic fluid interleukin 6 in preterm labor. Association with infection. J Clin Invest; 85:1392–1400.

Romero, R., Maymon, E., Pacora P., Gomez, R., Mazor, M., Yoon, B.H., Berry, S.M. 2000. Further observations on the fetal inflammatory response syndrome: a potential homeostatic role for the soluble receptors of tumor necrosis factor alpha. Am J Obstet Gynecol; 183:1070–1077.

Rosembau, P.; Paneth N, Leviton A, Goldstein M, Bax M, Damiano D, Dan B, Jacobsson B.2007.A report: the definition and classification of cerebral palsy april 2006. Developmental Medicine and Child Neurology. 49, 8:14.

Russman et al. 1997.Cerebral Palsy: A Rational Approach to a Treatment Protocol, and the Role of Botulinum Toxin in Treatment. Muscle & Nerve, Suppl.6.

Sankar C., Mundkur N. 2005. Cerebral palsy: definition, classification, etiology and early diagnosis. *Indian J Pediatr.* 72:865-8.8.

Shallice, T. 2002. Executive functions after frontal lobe injury: a developmental perspective. *Principles of frontal lobe function.* Oxford; New York: Oxford University Press. p. 261-277.

Stanley, F.J. Blair, E., Alberman, E. 2000. *Cerebral palsies epidemiology and causal pathways.* London Mac Keith Press.

Straub, K.; Obrzut, J. E. 2009. Effects of cerebral palsy on neuropsychological function. *Journal of Developmental and Physical Disabilities.* 21: 153-167.

Suppiej A, Franzoi M, Vedovato S, Marucco A, Chiarelli S, Zanardo V. 2009. Neurodevelopmental outcome in preterm histological chorioamnionitis. *Early Hum Dev.* 85, 187-9.

Surveillance of Cerebral Palsy in Europe (SCPE). 2002. Prevalence and characteristics of child with cerebral palsy in Europe. *Dev Med Child Neurol.* 44, 633-640.

Svedin, P., Kjellme, I., Welin, A., Blad, S.; Mallard, C.. 2005. Maturation Effects of Lipopolysaccharide on White-Matter Injury in Fetal Sheep. *J Child Neurol.* 20, 960-964.

Tâmega, I. E.; Barros F., A. A.; Pinto, E. A. L. C. 2011. Growth in children with encephalopathy, a longitudinal study from the 6th to the 24th month. *International Journal of Nutrition and Metabolis,* n. 5, p. 55-64.

Van Handel, M., Swaab, H., de Vries, L.S., Jongmans, M.J. 2007. Long-term cognitive and behavioral consequences of neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia: a review. *Eur J Pediatr.*166, 645-54.

Vincer, M.J., Allen, A.C., Joseph, K.S., Stinson, D.A., Scott, H., Wood, E. 2006 Increasing prevalence of cerebral palsy among very preterm infants: a population-based study. *Pediatrics.*118, 1621-6.

Volpe, J.J. 2001. Perinatal Brain Injury: From Pathogenesis to neuroprotection Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews. 7, 56–64.

Volpe, J. J. , Kinney, H. C., Jensen, F. E. , Rosenberg, P. A. 2011. Reprint of “The developing oligodendrocyte: key cellular target in brain injury in the premature infant”. 29, 565–582.

Weitzdoerfer, R., Pollak ,A., Lubec, B. 2004. Perinatal Asphyxia in the rat has lifelong effects on Nmorphology, cognitive functions, and behavior. *Seminars in Perinatology* 28, 249-256.

Wilson-Costello, D., Friedman, H., Minich, N., Fanaroff, A.A., Hack, M. 2005. Improved survival rates with increased neurodevelopmental disability for extremely low birth weight infants in the 1990s. *Pediatrics.*115, 997-1003.

Winter, S. Trends in the prevalence of cerebral palsy in a population-based study. *Pediatrics.* 110, 1220-1225.

Yoon, B.H., Park, C.W., Chaiworapongosa, T. 2003. Intrauterine infection and the development of cerebral palsy. *BJOG.* 110, 124-7.

