



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS MORFOFUNCIONAIS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL
PRECOCE E DA ESTIMULAÇÃO LOCOMOTORA EM UM MODELO DE
PARALISIA CEREBRAL EM RATOS**

Dissertação de Mestrado

André Luís Ferreira de Meireles

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS MORFOFUNCIONAIS DO ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL
PRECOCE E DA ESTIMULAÇÃO LOCOMOTORA EM UM MODELO DE
PARALISIA CEREBRAL EM RATOS**

André Luís Ferreira de Meireles

Orientadora: Profa. Dra. Simone Marcuzzo

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul como requisito parcial
para obtenção do título de mestre em
Neurociências

Porto Alegre

2015

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Simone Marcuzzo, pelos conselhos, confiança e dedicação durante a orientação.

Aos Meus pais e irmãos que, apesar da distância, sempre me apoiaram e me incentivaram durante esses dois anos.

À minha noiva Aline Cecília, pela compreensão, paciência, conselhos e apoio durante todo o período do mestrado.

As minhas ex-professoras e orientadoras, Rita de Cássia e Adriana Siqueira pelo incentivo inicial a pesquisa científica.

Aos colegas e amigos que conheci nessa bela cidade e que me ajudaram a esquecer a saudade de casa e tornar essa jornada mais divertida e prazerosa.

Aos amigos Marília Marques, Christiano Spindler e Ethiane Segabinazi que me ajudaram em todas as etapas do mestrado, que me fizeram rir quando na verdade eu queria chorar e que de fato deixaram esses dois anos muito mais agradáveis.

À Sílvia, Ethi, Otávio, Francele, Gabi, Christiano e Marília, e todos do grupo PND, sem vocês eu não conseguiria desenvolver essa pesquisa, muito obrigado pelos ensinamentos, paciência e uma mãozinha de vez em sempre.

Aos Professores do PPG Neurociências, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao PPG Neurociências e ao CNPq, pela bolsa.

“O sonho é que leva a gente para frente. Se a gente for seguir a razão, fica aquietado, acomodado.”

Ariano Suassuna

RESUMO

A paralisia cerebral (PC) é uma desordem atribuída a lesões não progressivas do encéfalo imaturo, que geram um quadro motor debilitante. A fisioterapia é indicada nesses pacientes com o intuito de desenvolver as habilidades, prevenir alterações osteomusculares e proporcionar qualidade de vida. Várias abordagens são propostas, com diferentes objetivos, como a estimulação precoce e o treinamento locomotor. Em modelos animais, essas estratégias podem ser comparadas às condições experimentais: enriquecimento ambiental (EA) e estimulação locomotora (EL), respectivamente. O EA é uma combinação de interação social, atividade física e aprendizagem, que visa proporcionar uma maior possibilidade de estímulos quando comparado à moradia padrão dos animais. A EL pode ser realizada com o auxílio da esteira ergométrica adaptada para ratos. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da associação do EA e da EL nos déficits motores e nas alterações musculares em um modelo de paralisia cerebral em ratos. O modelo de PC foi realizado pela associação de injeções intraperitoneais de lipopolissacarídeo no período gestacional em ratas Wistar, associado com a anóxia perinatal e a restrição sensorio motora (realizada por 27 dias, de maneira intermitente). Os filhotes machos foram divididos em 8 grupos: (PC), (PCEA), (PCEL), (PCEAEL) e seus respectivos grupos controle. As avaliações motoras (barra estreita e escada horizontal) ocorreram no dia pós natal (P) 31 e no P52. Também foi avaliado a área média das fibras dos músculos sóleo e tibial anterior. Tanto o EA, quanto o EL, isolados ou em associação, causaram uma melhora nos parâmetros motores avaliados (tempo de travessia nos aparatos, número de erros e escore de erros). Quanto a área média das fibras musculares, a EL foi capaz de minimizar a atrofia muscular tanto do músculo tibial quanto do sóleo, e a combinação das terapias foi capaz de reverter a atrofia apenas do músculo sóleo. Dessa forma, ambos os tratamentos trouxeram benefícios ao modelo de PC, porém, a combinação das duas abordagens englobou mais resultados positivos nos diferentes parâmetros avaliados.

ABSTRACT

Cerebral palsy (CP) is a disorder attributed to non-progressive lesions in the immature brain that will generate debilitating motor manifestations. Physiotherapy has been indicated for these patients with the purpose to develop the skills, prevent musculoskeletal changes and provide quality of life. Several approaches are proposed, with different aims, such as early stimulation and the treadmill walking. In animals models, these strategies can be compared with the following experimental conditions: enriched environment (EE) and the locomotor stimulation (LS), respective control groups. The EE is a combination of social interaction, physical activity and learning, which aims to provide a higher possibility of stimuli when compared to standard housing. LS can be performed using the treadmill adapted for rats. The aim of this study was to evaluate the effects of the combination of EE and LS in motor deficits and muscle changes in a model of cerebral palsy. CP model was induced by association of lipopolysaccharide intraperitoneal injections in gestational period in Wistar rats, combined with the perinatal anoxia and hindlimb sensorimotor restriction (performed for 27 days, intermittently). The male Pups were divided in 8 groups: (CP), (CPEE), (CPTW), (CPEETW) and its respectively control groups. Motor tasks (narrow bar and horizontal ladder test) occurred on the postnatal day (P) 31 and P52. Were assessed the mean area of the fibers of the soleus and tibialis anterior. Both the EE, as EL, alone or in combination, have caused an improvement in motor parameters evaluated (crossing time in the apparatus, the number of errors and error score). Regarding the mean area of the muscle fibers, the LS was able to minimize muscle atrophy as much as tibial muscle as the soleus and the combination of therapies was able to reverse the atrophy only the soleus muscle. Thus, both treatments have benefits to the CP model, however, the combination of the two approaches encompassed more positive results at the different evaluated parameters.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1 Paralisia Cerebral.....	11
1.2 Alterações Musculoesqueléticas.....	13
1.3 Modelos Animais na Paralisia Cerebral.....	15
1.4 Treinamento Locomotor.....	17
1.5 Enriquecimento Ambiental.....	18
1.6 Justificativa.....	20
2. OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo Geral.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Grupos Experimentais.....	22
3.3 Modelo Experimental de Paralisia Cerebral.....	23
3.4 Enriquecimento Ambiental.....	25
3.5 Estimulação Locomotora.....	25
3.6 Análise Comportamental.....	26
3.6.1 Barra estreita.....	26
3.6.2 Escada Horizontal.....	27
3.7 Análises Histológica dos Músculos Tibial Anterior e Sóleo.....	29
3.8 Análise Estatística.....	30
4. RESULTADOS.....	31

4.1 Teste Barra Estreita.....	31
4.1.1 Tempo de Travessia.....	31
4.1.2 Número de Erros.....	33
4.2 Teste Escada Horizontal.....	35
4.2.1 Tempo de Travessia.....	35
4.2.2 Escore de Erros.....	37
4.3 Análise do Músculo Tibial Anterior.....	39
4.4 Análise do Músculo Sóleo.....	41
5. Discussão Geral.....	44
6. Considerações Finais.....	49
7. Perspectivas.....	51
8. Referências.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

CT	Controle
EA	Enriquecimento Ambiental
EAEL	Enriquecimento Ambiental + Estimulação Locomotora
EL	Estimulação Locomotora
HI	Hipóxia-Isquemia
LPS	Lipopolissacarídeo
LPV	Leucomalácia Periventricular
P0	Dia do nascimento
P2	Segundo dia pós-natal
P29	Vigésimo nono dia pós-natal
P31	Trigésimo primeiro dia pós-natal
P52	Quinquagésimo segundo dia pós-natal
PA	Anóxia Perinatal
PC	Paralisia Cerebral
PCEA	Paralisia Cerebral + Enriquecimento Ambiental
PCEAEL	Paralisia Cerebral + Enriquecimento Ambiental e Estimulação Locomotora
PCEL	Paralisia Cerebral + Estimulação Locomotora
SNC	Sistema Nervoso Central
SR	Restrição Sensório-Motora

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Associação dos mecanismos mecânicos e neurais causados pela lesão do neurônio motor superior que gerarão a característica de patologia musculoesquelética à paralisia cerebral.....PÁG 14.
- Figura 2.** Linha do tempo com os principais eventos do projeto.....PÁG 25.
- Figura 3.** Escada Horizontal. (METZ; WHISHAW, 2002).....PÁG 27.
- Figura 4.** Tempo de travessia na barra estreita no P31.....PÁG 32.
- Figura 5.** Tempo de travessia na barra estreita no P52..... PÁG 32.
- Figura 6.** Número Médio de erros na barra estreita no P31.....PÁG 34.
- Figura 7.** Número Médio de erros na barra estreita no P52.....PÁG 34.
- Figura 8.** Tempo de travessia na escada horizontal no dia P31.....PÁG 36.
- Figura 9.** Tempo de travessia na escada horizontal no dia P52.....PÁG 36.
- Figura 10.** Escore de erros por passos no dia P31.....PÁG 38.
- Figura 11.** Escore de erros por passos no dia P52.....PÁG 38.
- Figura 12.** Média da área transversal das fibras musculares do músculo tibial.....PÁG 39.
- Figura 13.** Imagens digitalizadas de cortes transversais semifinos (1 μm) do músculo tibial anterior.....PÁG 40.
- Figura 14.** Média da área transversal das fibras musculares do músculo sóleo.....PÁG 42.
- Figura 15.** Imagens digitalizadas de cortes transversais semifinos (1 μm) do músculo sóleo.....PÁG 43.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Paralisia Cerebral

A Paralisia Cerebral (PC) é um grupo de desordens permanentes do movimento e da postura, causando limitações de atividades laborais e da vida diária. Essas desordens são atribuídas a distúrbios não progressivos que ocorrem no encéfalo fetal ou infantil em desenvolvimento; insultos ainda no útero, no momento do parto e até dois anos após o nascimento podem gerar lesões no Sistema Nervoso Central (SNC) que caracterizarão a PC (KNOW et al., 2013; ROSEMBAUMET et al., 2007; KOMAN, et al., 2004).

A PC é a causa mais comum de deficiência física encontrada em crianças, com uma prevalência estimada de 2,0 – 2,5 por mil nascidos vivos em populações ocidentais (OSKOUI et al., 2013). Uma importante parcela (70 a 80%) dos casos registrados de PC ocorre no período pré-natal, tendo como principais etiologias a asfixia, os traumas e as infecções. Dentre os principais insultos perinatais, se destacam o baixo peso ao nascimento, restrição do crescimento intrauterino, hemorragia intracraniana e traumatismo encefálico. No período pós-natal, as causas mais comuns são encefalite, icterícia neonatal, traumas e meningite (JOHSTIN, HOOM, 2006; KRIGGER, 2006; JAN, 2006).

Diversas partes do encéfalo, como córtex cerebral, tálamo, cerebelo, núcleos da base, substância branca e outras áreas encefálicas podem ser acometidas, gerando assim, quadros clínicos diferenciados (VOLPE, 2003; FOLKERTH, 2005; KEOGH; BADAWI, 2006, STANLEY, et al., 2000). Assim, o

quadro clínico da PC estará intimamente relacionado com a área ou áreas encefálicas lesadas e, em geral, é observado atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, alterações posturais e de tônus muscular, déficit cognitivo e de comunicação, como também a presença de epilepsia, convulsões, distúrbios sensoriais e alterações osteomioarticulares secundárias (PAVÃO et al., 2013; HIMMELMANN et al., 2011; BADAWI, KEOGH, 2012; STANLEY et al., 2000).

Uma das formas utilizadas para classificar a paralisia cerebral é pela distribuição topográfica das manifestações motoras, sendo utilizados os termos hemiplegia, quando há comprometimento motor de apenas um hemicorpo, monoplegia, quando somente um membro é afetado, diplegia, quando os membros inferiores são mais acometidos, triplegia, quando apenas um dos membros não é acometido e a quadriplegia, quando todos os membros são afetados (OEFFINGER, et al., 2004).

Estudos conduzidos em centros europeus, com auxílio de exames de imagem, verificaram que a lesão mais comum nas crianças com PC são as lesões da substância branca (leucomalácia periventricular), seguidas de lesões nos gânglios da base, no córtex e em áreas subcorticais (BAX, et al., 2006). A leucomalácia periventricular (LPV) é a degradação da substância branca por insultos aos oligodendrócitos, em sua grande maioria, causados por eventos hipóxico isquêmicos (DAMMAN; HAGBERG; LEVITON, 2001). Tanto a LPV, quanto os eventos hipóxico-isquêmicos, irão gerar alterações motoras no paciente com PC pelo dano causado ao trato corticoespinal, que é composto de axônios de neurônios descendentes motores que cursam através da região periventricular (CAHILL-ROWLEY; ROSE, 2013; KHWAJA; VOLPE, 2008).

1.2 Alterações Musculoesqueléticas na Paralisia Cerebral

Embora as lesões geradas no SNC dos pacientes com PC sejam não progressivas, as alterações secundárias como dor, luxações, atrofia muscular, perda da mineralização óssea, que são geradas por essa lesão primária, poderão ser progressivas e gerar grande dependência a esses pacientes (GRAHAM; SELBER, 2003; FOLKERTH, 2005).

A lesão encefálica, na maioria dos casos, irá danificar os neurônios motores superiores localizados no córtex cerebral que emitem os principais tratos axonais descendentes motores, como o trato corticoespinal e o trato reticuloespinal. Esse dano irá alterar, ou até mesmo impedir, a forma como as informações motoras ou *inputs* motores descenderão até a medula espinal para que ocorra o ato motor. A lesão do neurônio motor superior irá gerar uma diversa gama de acontecimentos neurais e mecânicos que irão contribuir para formação de uma patologia não só com aspectos neurológicos, mas também, com caráter musculoesquelético bastante evidente (veja o esquema apresentado na Figura 1), que repercutirá em diminuição da força muscular, alterações na marcha, dificuldade de deambulação, maior gasto energético nos movimentos, diminuição da mineralização óssea e, conseqüentemente, uma maior dependência nas atividades diárias (VOLPE, 2003; GRAHAM; SELBER, 2003; FOLKERTH, 2005; JOHNSTON; HOON, 2006).

Um dos pontos principais para as alterações musculares no paciente com PC é o crescimento longitudinal retardado dos músculos esqueléticos. Em condições fisiológicas, o crescimento muscular é regulado por tensão (alongamento) e relaxamento. Nas crianças com PC os músculos esqueléticos

não relaxam durante as atividades por conta da espasticidade e, conseguinte, essas crianças têm um menor nível de realização de atividades laborais ou diárias, gerando um ciclo de desuso que agrava o quadro motor e dependência geral (GRAHAM; SELBER., 2003; JAN, 2006; LIEBER; MATHEWSON, 2015).

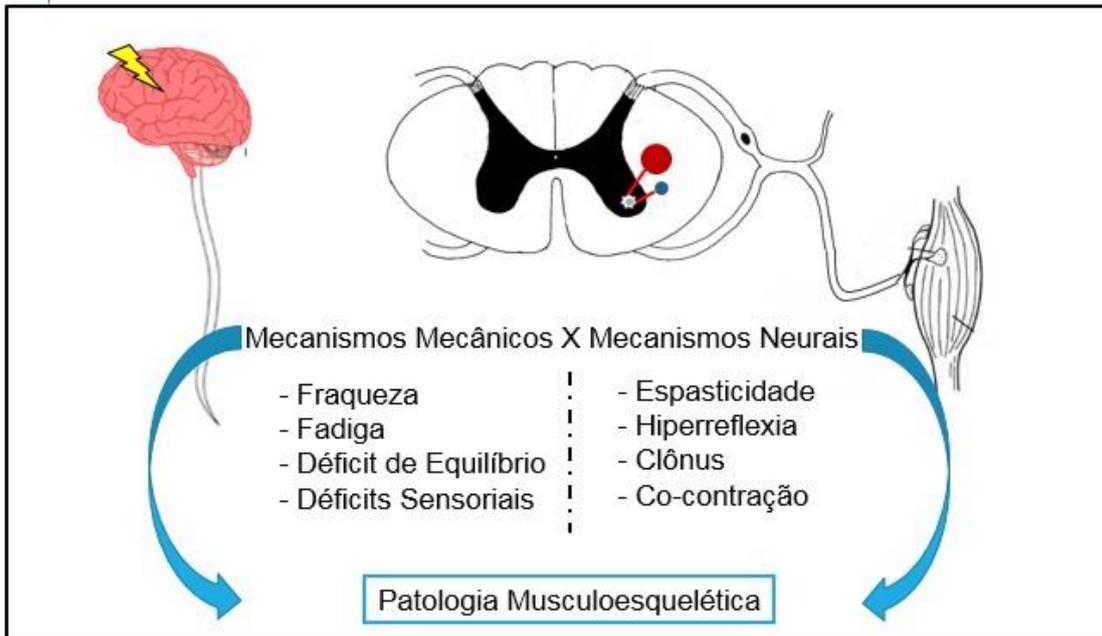


Figura 1. Associação dos mecanismos Mecânicos e Neurais gerados pela lesão do neurônio motor superior na PC, que gerarão a característica de patologia musculoesquelética.

1.3 Modelos Animais na Paralisia Cerebral

Há diversos modelos que visam mimetizar a paralisia cerebral em roedores. Entre eles, o modelo de hipóxia-isquemia (HI) é bastante utilizado, possivelmente por ser o principal fator relacionado ao aparecimento da LPV e pelo fato das células precursoras dos oligodendrócitos terem uma particular vulnerabilidade à isquemia (VOLPEM, 2001; LUBICS, et al., 2005; CLOWRY; CHAN, 2014). Porém, embora o modelo de HI seja capaz de gerar atrofia em várias regiões encefálicas, como hipocampo, estriado e córtex motor, as alterações motoras são bastante sutis e transitórias, não comparáveis ao quadro motor que define a PC (JANSEN; LOW, 1996; HOEGER, et al., 2000; ROBINSON et al., 2005; CLOWRY; CHAN 2014).

Outro fator etiológico relacionado a PC são as respostas inflamatórias maternas/neonatais infecciosas ou não, que podem contribuir para uma lesão encefálica neonatal (CALLAGAHAN et al., 2011; WU et al., 2013; GILBERT, et al., 2010). De fato, estudos experimentais têm mostrado que a pré-exposição ao lipopolissacarídeo (LPS; um dos componentes principais da membrana exterior de bactérias gram-negativas, uma endotoxina que provoca uma forte resposta imunológica) aumenta dramaticamente a vulnerabilidade do encéfalo imaturo à HI (XU et al., 2013, LAROUCHE et al., 2005; GIRARD et al., 2008). Girard e cols. (2008) observaram que a indução de uma resposta inflamatória pela exposição de ratas prenhes à injeção intraperitoneal de LPS no período embrionário (17^o dia) até o final da gestação, combinada à HI (induzida pela ligadura permanente da artéria carótida comum direita), 24 horas após o parto,

ocasionou déficits motores e lesões corticais e subcorticais mais extensas, comparados aos procedimentos isolados.

Contudo, estudos mostraram que modelos animais que utilizaram LPS e HI, associados ou não, embora também causem lesões encefálicas e déficits motores, não reproduziram fenótipos típicos à PC em humanos. Por essa razão, Strata e cols. (2004), propuseram um modelo animal que combinou a anóxia perinatal com a restrição de movimentos dos membros posteriores de ratos Sprague–Dawley, prejudicando a aquisição da marcha, denominada restrição sensório-motora. Com essa abordagem, observaram alterações na marcha e modificações na representação dos membros posteriores no córtex motor M1. A reprodução desse modelo em ratos Wistar mostrou resultados semelhantes: diminuição no tamanho da passada e no diâmetro médio das fibras musculares do sóleo (MARCUIZZO et al., 2008).

Na busca de um modelo que refletisse mais fielmente a PC, mais um fator etiológico comumente observado nessa patologia, a inflamação gerada por uma infecção, foi adicionada à indução do modelo por Stigger e cols. (2011a). Para tanto, ratas prenhes foram submetidas às injeções de LPS no período gestacional, combinada à anóxia perinatal e à restrição sensória motora (STIGGER, et al., 2011a). Foram observados achados semelhantes aos já citados (MARCUIZZO, et al., 2008; STRATA, et al., 2004).

1.4 Treinamento Locomotor

Ainda não há um tratamento que leva à cura da PC. Entretanto, há diversas terapias que visam prevenir as alterações secundárias e maximizar a qualidade de vida e independência desses pacientes (DAMIANO, 2006; KNOW, et al., 2013). O treinamento locomotor utilizando uma esteira ergométrica para estimular a marcha vem sendo estudado com esse intuito (RICHARDS, et al., 1997; CHRYSAGS, et al., 2012). Em pacientes com PC, o treinamento locomotor é capaz de gerar benefícios, como o aumento na velocidade da marcha, melhora de parâmetros cinemáticos e biomecânicos da marcha, controle postural, melhora no equilíbrio, aumento do condicionamento cardiorrespiratório e resistência física (CHRYSAGS, et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; WILLOUGHBY; DODD; SHIELDS, et al., 2009).

Em modelo animal de PC (restrição sensório-motora, associada ou não à anóxia) a estimulação locomotora com auxílio de esteira ergométrica melhorou vários parâmetros funcionais, morfológicos musculares e na medula espinhal lombar de ratos (MARCUIZZO et al., 2008; STIGGER et al., 2011b). Porém, nesses estudos a estimulação locomotora foi realizada após a indução do modelo experimental, ou seja, quando os déficits motores estão estabelecidos, o que, comparado à evolução da PC, seria o período em que já se encontram os encurtamentos musculares e até mesmo deformidades osteoarticulares.

1.5 Enriquecimento Ambiental

Durante o desenvolvimento, o encéfalo é muito plástico e com as crianças com PC não é diferente. Entretanto, se essas crianças não são tratadas precocemente, terão um “adormecimento” de vias motoras não utilizadas, como também um reforço negativo de padrões de movimento anormais, modificando assim, de forma geral, as vias e tratos responsáveis pelo controle motor. A intervenção precoce nesses pacientes é de suma importância para evitar o desuso durante o desenvolvimento das vias motoras e prevenir que sejam gerados padrões de movimentos anormais que irão, posteriormente, piorar o quadro clínico motor desse paciente (DAMIANO, 2006; BLAUW-HOSPERS; HADDERS-ALGRA, 2005).

O Enriquecimento Ambiental (EA) é uma estratégia experimental utilizada para incrementar os estímulos do ambiente em que os animais vivem. No EA combinam-se estímulos sensoriais, cognitivos, sociais e motores (VAN PRAAG et al., 2000). De forma geral, os animais alocados no EA são mantidos em gaiolas maiores e em grupos maiores do que o padrão, o que possibilita uma maior interação social. Os estímulos do EA poderão variar no decorrer do experimento, com adição e modificação na disposição de objetos dentro das gaiolas; frequentemente também é dada a oportunidade para a realização da atividade física voluntária, utilizando rodas de corrida de livre acesso (VAN PRAAG et al., 2000; NITHIANANTHARAJAH; HANNAN, 2006; SINGHAL; et al., 2014).

Estudos têm mostrado que o EA promove plasticidade em regiões encefálicas como córtex, estriado e, principalmente, hipocampo, havendo

aumento na densidade sináptica, nas ramificações dendríticas e nos níveis de sinaptofisina e fatores neurotróficos (VAN PRAAG et al., 2000; LLORENS-MARTIN et al., 2007; PIAZZA et al., 2011). O EA também se mostrou eficiente em promover a recuperação dos déficits de memória espacial, sendo eficaz na redução dos déficits cognitivos gerados pela HI neonatal, isquemia focal e global e doença de Alzheimer (JANKOWSKY et al., 2005; PEREIRA et al., 2007). Assim, estudos têm relacionado o EA precoce com a estimulação precoce utilizada em humanos, uma vez que estimulação sensorial, cognitiva e motora são encontradas em ambas (MARQUES, et al., 2014, HERSKIND; GREISEN; NIELSEN, 2014).

1.6 Justificativa

A PC é uma doença com um amplo espectro etiológico e alta incidência em países em desenvolvimento, além disso é uma das principais doenças que debilitam o aparelho locomotor na infância.

Muitas terapias têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas a fim de atenuar o quadro motor e gerar uma maior funcionalidade para o paciente com PC. A fisioterapia tem um papel importante para a reabilitação motora desses pacientes. Técnicas como estimulação precoce, treinamento locomotor em esteira, hidroterapia, equoterapia, vêm sendo cada vez mais estudadas visando estabelecer protocolos e aumentar os níveis de evidência. Entretanto, ainda há uma lacuna sobre efeitos biológicos reais dessas terapias.

Desta forma, com o objetivo de se aproximar mais do tratamento que é realizado correntemente na clínica, nos propusemos a estudar a combinação dos dois tratamentos: enriquecimento ambiental (simulando, com as devidas restrições translacionais, a estimulação precoce em crianças) e a estimulação locomotora, a fim de observar e elucidar os possíveis mecanismos biológicos da associação dessas duas intervenções no modelo de PC. O EA será realizado durante a indução do modelo de PC, ou seja, durante o período de restrição sensório-motora, o que na prática clínica corresponderia a prevenir a instalação das alterações osteoarticulares, e após o período de restrição sensório-motora como terapia isolada ou adicional. E a EL será realizada após os ratos terem um mês de vida. Esse período pode ser comparado a quando a criança com PC já adquiriu capacidade de deambulação independente ou com auxílio.

2. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo Geral*

- Analisar os efeitos isolados e associados do enriquecimento ambiental e da estimulação locomotora em esteira ergométrica nos déficits motores e nas alterações musculares em um modelo de paralisia cerebral em ratos.

2.2 *Objetivos Específicos*

- Analisar os efeitos de cada tratamento isolado (enriquecimento ambiental ou estimulação locomotora em esteira ergométrica) e a combinação dos dois nas alterações motoras, utilizando as avaliações na escada horizontal e barra estreita, em ratos submetidos ao modelo de paralisia cerebral;

- Examinar a área média das fibras do músculo sóleo e do tibial anterior em cada tratamento isolado (enriquecimento ambiental ou estimulação locomotora em esteira ergométrica) e a combinação dos dois, em ratos submetidos ao modelo de paralisia cerebral;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, 40 fêmeas e 15 machos com 75 dias de idade, procedentes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS – (precedente de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS – nº 25559). Os animais foram transferidos para o ratário do Departamento de Ciências Morfológicas, do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Após uma semana de ambientação, as ratas foram submetidas a exames colpocitológicos para detectar a fase do ciclo estral. As fêmeas foram colocadas em caixas individuais com machos assim que estivessem na fase receptiva ao macho, assim permanecendo até o dia seguinte quando foi realizado um novo exame colpocitológico confirmando ou não o acasalamento. Todos os animais 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 11.794/08 de 08/10/08 que regulamenta o uso de animais para pesquisas científicas.

3.2 Grupos Experimentais:

Os filhotes machos foram aleatoriamente divididos nos seguintes grupos:

1. Grupo Controle (CT) (n= 8);
2. Grupo Controle Enriquecimento Ambiental (EA) (n= 12);
3. Grupo Controle Estimulação Locomotora em Esteira (EL) (n= 13);

4. Grupo Controle Enriquecimento Ambiental associado à Estimulação Locomotora em Esteira (EAEL) (n= 12);
5. Grupo PC (PC) (n= 10);
6. Grupo PC submetido ao Enriquecimento Ambiental (PCEA) (n= 10);
7. Grupo PC submetido à Estimulação Locomotora em Esteira (PCEL) (n= 10);
8. Grupo PC submetido ao Enriquecimento Ambiental associado à Estimulação Locomotora em Esteira (PCEAEL) (n= 10);

3.3 Modelo Experimental de Paralisia Cerebral

As ratas prenhes foram mantidas em condições padrão de biotério até o 17º dia de gestação (E17). No E17 as ratas receberam injeções intraperitoneais de LPS (200 µg/Kg diluído em 100 µL de salina estéril; i.p) realizadas de 12 em 12h até o 21º dia de gestação (E21) (STIGGER, et al., 2011a).

Em até 12 horas após o nascimento dos filhotes, foram realizadas a sexagem e a redução das ninhadas a 8 animais (no máximo) e 5 (no mínimo). No caso de número excedente de animais na ninhada, foram descartadas as fêmeas, sendo submetidas à eutanásia por meio de decapitação (conforme orientação de PAIVA et al., 2005), realizada por um profissional com treinamento e experiência, bem como com os instrumentos adequados, levando à morte instantânea. Em seguida, filhotes escolhidos aleatoriamente foram expostos à anóxia por 20 minutos no dia do nascimento (P0). Neste procedimento os ratos foram alocados em uma câmara com temperatura

controlada ($37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) com um fluxo de 9L/min contínuo de nitrogênio a 100%. Após a asfixia, os filhotes foram colocados em condições atmosféricas normais, ressuscitados e devolvidos às mães, permanecendo em ambiente padrão ou ambiente enriquecido, conforme a divisão dos mesmos nos grupos experimentais. Cada caixa moradia padrão ou do enriquecimento ambiental continha apenas uma ninhada.

Do P2 ao P28 foi realizada a restrição sensório-motora dos filhotes por 16 horas por dia, ficando as 8 horas restantes livres dos aparatos de restrição. Os membros posteriores foram mantidos estendidos e aduzidos com uma fita adesiva e uma moldura feita de um material moldável (epóxi), essa restrição permite somente alguns movimentos limitados no quadril. Esse procedimento foi bem tolerado pelos filhotes e não prejudicou a eliminação de urina e fezes, como também não interferiu nos cuidados maternos.

No P21, foi feito o desmame dos filhotes, sendo as mães submetidas à eutanásia pela injeção intraperitoneal do anestésico geral Pentobarbital Sódico associado à Lidocaína; esta solução é usada para minimizar a irritação e a dor causada pela administração isolada do Pentobarbital Sódico (Paiva et al., 2005; CONCEA, 2013; AMBROSE, et al., 2000).

O esquema do desenho experimental está exposto na Figura 2.

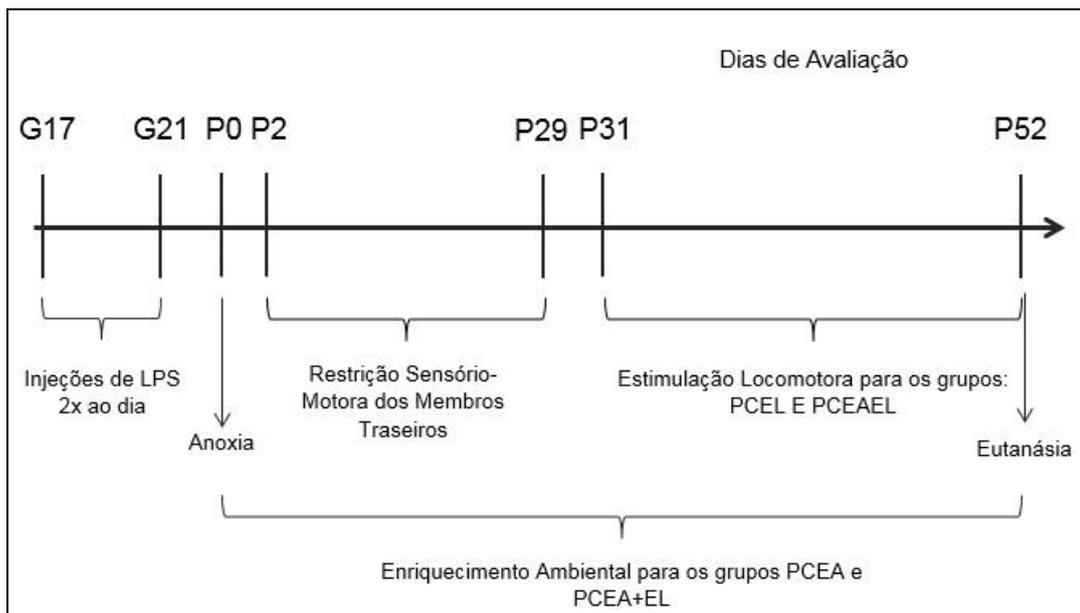


Figura 2. Linha do tempo dos procedimentos experimentais.

3.4 Enriquecimento Ambiental

O enriquecimento ambiental foi realizado continuamente desde o nascimento até o P52 nos grupos PCEA, PCEAEL, EA e EAEL.

Os animais foram mantidos com suas mães (até o P21) em gaiolas grandes com diversos objetos, tais como: bolas, rampas, túneis, cubos e rodas de corrida. Além disso, semanalmente foram introduzidos novos objetos ao EA, com finalidade de gerar novidades ao ambiente. As gaiolas foram limpas duas vezes por semana (MARQUES, et al., 2014; MATTER, et al., 2011).

3.5 Estimulação Locomotora

O protocolo de estimulação locomotora em esteira ergométrica foi adaptado de Marcuzzo e cols. (2008) e consistiu no treino dos animais em uma

esteira ergométrica (0° de inclinação), 5 vezes por semana, com duração de 1 minutos na primeira semana e aumentando progressivamente até 25 minutos na última semana; a velocidade foi progressivamente aumentada em cada semana. Do P31 ao P52 os animais dos grupos PCEL, PCEAEL, EL e EAEL participaram deste protocolo.

3.6 Análise Comportamental

As análises comportamentais foram realizadas no P31 nos grupos CT, EA, PC e PCEA com o objetivo de avaliar os efeitos preventivos do EA diante do modelo de PC, e no P52 em todos os grupos, para avaliar os efeitos dos tratamentos isolados ou combinados nas alterações motoras geradas pelo modelo.

3.6.1 Barra Estreita

A barra estreita utilizada nesse estudo tinha 125 cm de comprimento, em forma de retângulo (3cm x 4cm). A barra foi suspensa à 60 cm do chão por 2 suportes de acrílico em suas extremidades.

A barra era demarcada nos primeiros 20 cm indicando o início da travessia. Os animais eram colocados em uma extremidade da barra e na outra extremidade continha uma caixa escura com a maravalha da caixa moradia do animal que estava sendo testado.

Na realização do teste, o animal atravessava de uma extremidade a outra, em direção à caixa escura. Após os membros posteriores dos ratos cruzarem a marca inicial de 20 cm, o tempo de travessia começou a ser

registrado, tendo seu término no momento em que os ratos colocavam os membros posteriores dentro da caixa escura. Também foi verificado a quantidade de erros cometidos durante a travessia na barra. Eram considerados erros quando um ou ambos os membros posteriores deslizavam para fora da barra ou quando os membros não eram colocados na barra. Foram realizadas 3 *trials* por animal e o resultado por rato é uma média desses 3 *trials* (MARQUES, et al., 2014; KLINE, et al., 2010).

3.6.2 Escada Horizontal

A escada horizontal utilizada no presente estudo é composta de 2 placas transparentes de acrílico, com 100 cm de comprimento x 20 cm de altura cada e com furos sequenciais a cada 1 cm, onde eram colocadas hastes metálicas de 3 mm de diâmetro (Figura 3). O aparato foi suspenso a 40 cm do chão por 4 suportes de plástico, dois em cada extremidade do aparato. Os animais eram colocados na extremidade inicial do aparato e na outra extremidade foi colocado uma caixa escura com a maravalha da caixa moradia do animal avaliado.

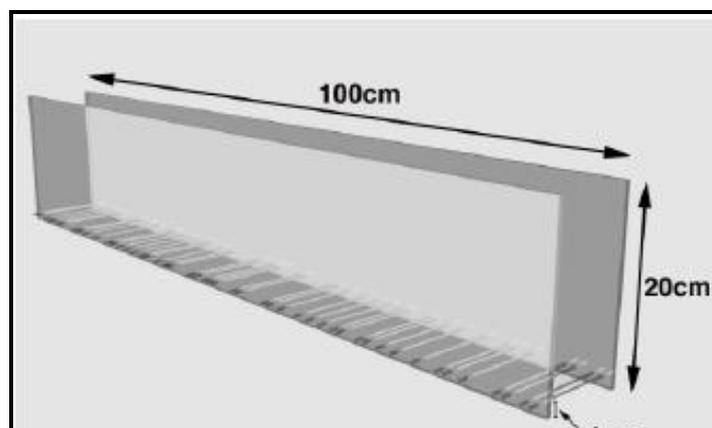


Figura 3. Escada Horizontal. (METZ; WHISHAW, 2002)

Na realização do teste, o rato atravessava o aparato da extremidade de início para a caixa escura na outra extremidade do aparato. Foram realizados 5 *trials*, todos filmados utilizando uma câmera (DCR – SX21 – Sony, Japão). Na análise das filmagens, *frame by frame* 30 quadros / segundo, foram observados os seguintes parâmetros: tempo de travessia ao aparato, escala de erros, número de erros e número de passos.

A escala de erros consiste em 6 categorias: (0) erro total – Quando o membro posterior caía no vão entre os degraus sem tocá-los. (1) Deslizamento Profundo – O membro posterior pisa no degrau mas escorrega e cai após o peso do corpo ser depositado no membro. (2) Deslizamento Rápido – O membro é colocado no degrau, há o deslizamento do membro quando o peso é transferido, mas não resulta em queda e interrupção do ciclo da marcha. (4) Recolocação – O membro é direcionado para um degrau, mas é colocado em outro degrau sem tocar no direcionado inicialmente ou ainda quando um membro foi colocado em um degrau e rapidamente reposicionado. (5) Colocação Parcial – O membro foi colocado com os dois membros simultaneamente no degrau ou os calcanhares ou dedos tocaram o degrau. (6) Colocação Correta – A porção média da pata é colocada no degrau possibilitando distribuição e suporte do peso. Foi realizada a média dos 5 *trials* para análise.

Para o número de erros foi utilizado um sistema de pontuação para as falhas dos membros, um erro foi definido como cada colocação dos membros que recebeu uma pontuação 0, 1 ou 2, equivalentes a escala de erros descrita anteriormente, isto é, um erro constitui qualquer tipo de erro que venha a

interromper o ciclo da marcha com um deslize ou queda de membro. O número de erros e o número de passos por membro foi registrado separadamente, a partir desses dados o número médio de erros por passos foi obtido (METZ; WHISHAW, 2009; METZ; WHISHAW, 2002).

3.7 Análise Histológica dos Músculos Tibial Anterior e Sóleo

Após as avaliações, 5 a 7 animais de cada grupo foram anestesiados com tiopental sódico, concentração de 50mg/mL e dose de 50 mg/Kg (i.p.) diluído em lidocaína com concentração de 10mg/mL e dosagem de 6mg/kg. Depois de profundamente anestesiados, os animais receberam 1000 UI de heparina no ventrículo cardíaco esquerdo (Cristália, Brasil). A perfusão transcardíaca foi iniciada com solução salina, seguida de paraformaldeído (Shynth, Brasil) 4% diluído em tampão fosfato 0,1M e pH 7,4 (Conforme protocolo utilizado em (MARCUIZZO et al., 2008, MARCUIZZO et al., 2010, STIGGER et al., 2011^a).

Após a realização das perfusões, o músculo sóleo e o tibial anterior foram cuidadosamente removidos. Pequenas amostras da parte central dos músculos (2 x 1 mm) foram obtidas e pós-fixadas até o processamento. Para o processamento, as amostras foram lavadas e desidratadas em séries graduais de álcool e óxido propileno (Electron Microscopy Sciences, USA) e incluídas em resina (Durcupan, ACM-Fluka, Switzerland) permanecendo no vácuo por 24h e, após, polimerizadas por 48h em 60°C. Cortes transversais semifinos (1 µm) foram obtidos utilizando um ultramicrotomo (MT 6000-XL, RMC, Tucson,

USA) e logo após os cortes foram corados com azul de toluidina 1% (Merck, Germany) em tetraborato de sódio (Ecibra, Brazil).

As imagens do material foram obtidas e digitalizadas utilizando-se um microscópio Nikon Eclipse E-600 (200 X e amplificadas mais 100% para análise) acopladas a uma câmera CCD Pro-Series “*Hight Performance*”. Para as avaliações quantitativas foi utilizado o *Software Image Pro-Plus 4.1 (Media Cybernetic, USA)*.

Foi realizada a área da secção transversal média das fibras dos músculos sóleo e tibial anterior pela a estimativa da área média (μm^2).

3.9 Análise Estatística

Os dados referentes aos testes comportamentais realizados no dia P31 foram avaliados por ANOVA de duas vias, já os realizados no P52 foram avaliados por ANOVA de três vias, assim como a área média dos músculos sóleo e tibial, todos seguidos do teste *post hoc* de Tukey. Os dados são descritos como médias \pm erro padrão (EP).

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software *Statistica 12*.

4. RESULTADOS

4.1 Teste Barra Estreita

4.1.1 Tempo de Travessia

Os dados referentes ao tempo de travessia da barra estreita nos dias P31 e P52, estão dispostos na Figura 4 e 5, respectivamente. A variável *tempo de travessia* foi avaliada pela ANOVA de duas vias no P31 e de três vias no P52. Não houve diferenças significativas no tempo de travessia no P31. No P52 o resultado geral da ANOVA de três vias mostrou diferença significativa nos fatores *lesão* [$F(1,74) = 59,49$ ($p < 0,05$)] e *enriquecimento* [$F(1,74) = 8,46$ ($p < 0,01$)]. Houve interação significativa entre os fatores *lesão X enriquecimento* [$F(1,74) = 5,73$ ($p < 0,05$)].

O teste *post hoc* de Tukey revelou que no P52 o grupo EL demorou menos tempo para atravessar a barra estreita comparado com o grupo PC ($p < 0,05$) e que o grupo PCEAEL também levou menos tempo na travessia quando comparado ao grupo PC ($p < 0,05$). Esses achados indicam que a associação de tratamentos foi capaz de minimizar um dos efeitos negativos gerados pelo modelo de PC.

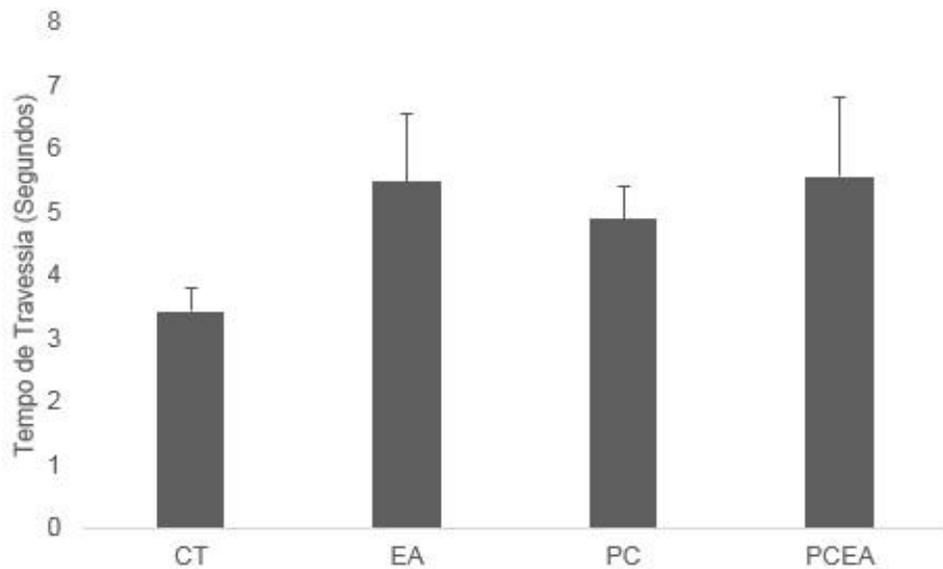


Figura 4. Tempo de travessia na barra estreita no P31. Os dados estão expressos como média \pm EP. Não houve diferenças significativas. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de Tukey, $p < 0,05$.

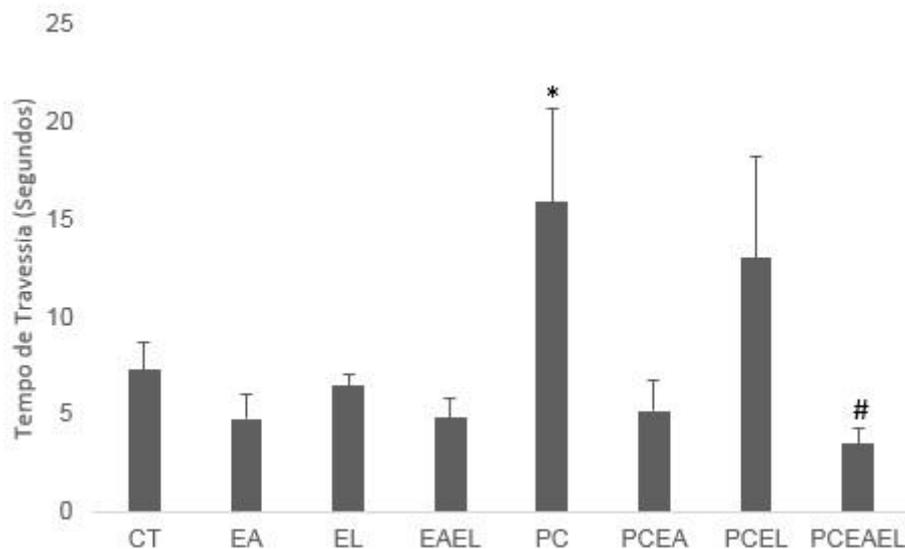


Figura 5. Tempo de travessia na barra estreita no P52. Os dados estão expressos como média \pm EP. *Diferença do grupo PC comparado ao grupo EL. #Diferença do grupo PC comparado ao grupo PCEAEL. ANOVA de três vias seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0,05$.

4.1.2 Número de Erros

O resultado geral da ANOVA de duas vias mostrou diferenças significativas nos fatores *lesão* [$F(1,34) = 26,23$ ($p < 0,001$)] e *enriquecimento* [$F(1,34) = 6,05$ ($p < 0,05$)] no P31. No P52, a ANOVA de três vias mostrou diferenças significativas nos fatores *lesão* [$F(1,74) = 10,06$ ($p < 0,01$)] e *enriquecimento* [$F(1,74) = 23,44$ ($p < 0,001$)]. Houve a seguinte interação significativa: *lesão X enriquecimento* [$F(1,74) = 7,35$ ($p < 0,01$)].

O teste *post hoc* de Tukey revelou que no P31 a média do número de erros do grupo PC foi superior aos grupos CT, EA ($p < 0,001$), e PCEA ($p < 0,05$) indicando alterações motoras no modelo de PC e um efeito preventivo do enriquecimento ambiental perante o modelo (Figura 6).

Assim como no P31, no P52 os grupos controle continuaram a diferir do grupo PC ($p < 0,001$) indicando que a alteração motora persistiu com o passar do tempo. Como observado no P31 o EA gerou um efeito preventivo no modelo refletido pelo menor número médio de erros, esse dado também é observado no P52 onde os grupos PCEA e PCEAEL apresentaram menos erros comparado o grupo PC ($p < 0,001$), mostrando um efeito preventivo e reabilitativo do enriquecimento ambiental (Figura 7).

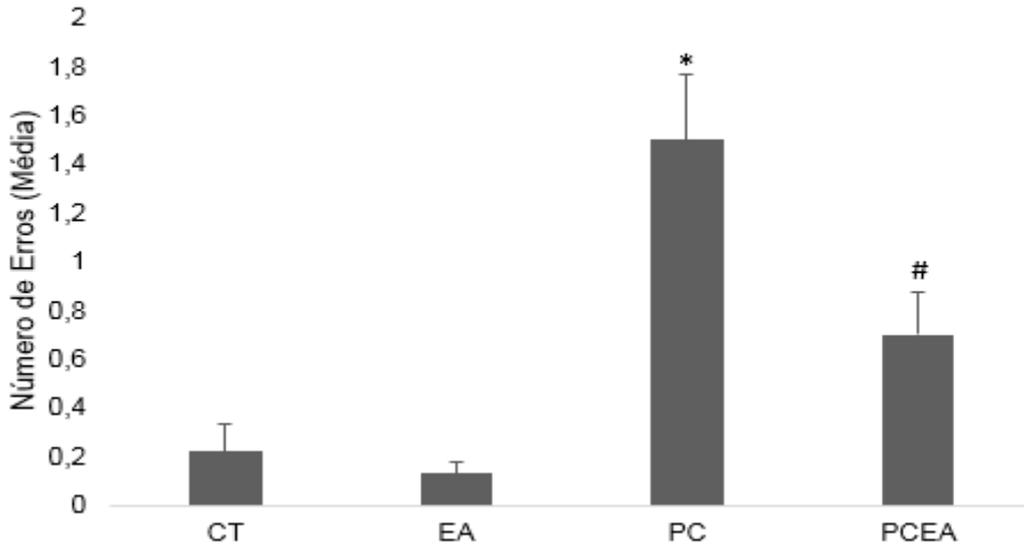


Figura 6. Número Médio de erros na barra estreita no P31. Os dados estão expressos como média \pm EP. *Diferença do grupo PC comparado aos grupos CT e EA. #Diferença do grupo PC comparado ao grupo PCEA. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc Tukey, $p < 0,05$.

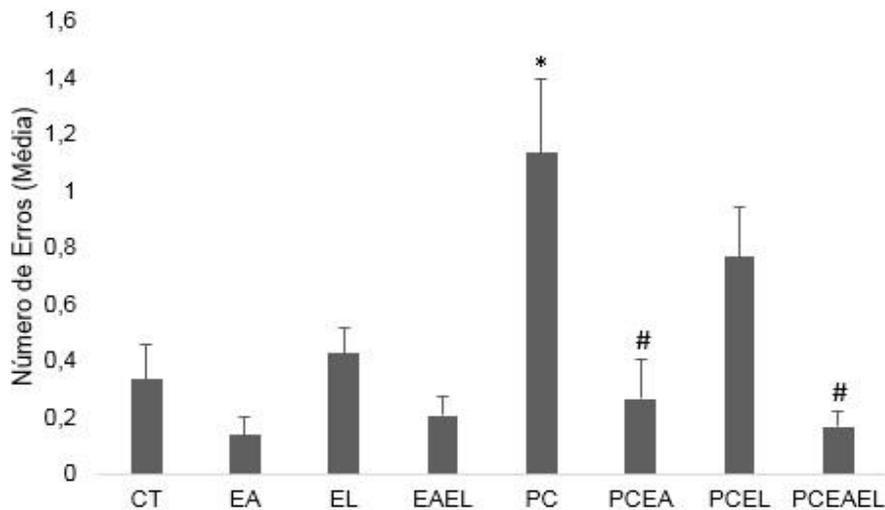


Figura 7. Número médio de erros na barra estreita no P52. Os dados estão expressos como média \pm EP. *Diferença do grupo PC comparado aos grupos controle. #Diferença do grupo PC comparado ao grupo PCEA e PCEAEL. Os resultados foram analisados por ANOVA de três vias seguida pelo teste post hoc Tukey, $p < 0,05$.

4.2 Teste da Escada Horizontal

4.2.1 Tempo de Travessia

A ANOVA de duas vias mostrou que houve diferença significativa nos fatores *lesão* [$F(1,34) = 9,15$ ($p < 0,01$)] e *enriquecimento ambiental* [$F(1,34) = 12,43$ ($p < 0,01$)]. Houve interação significativa entre *lesão X enriquecimento* [$F(1,34) = 6,39$ ($p < 0,05$)]. No P52, a ANOVA de três vias mostrou que houve diferenças significativas nos fatores *lesão* [$F(1,74) = 6,60$ ($p < 0,05$)] e *enriquecimento ambiental* [$F(1,74) = 5,80$ ($p < 0,05$)]. Houve interação significativa entre *lesão X enriquecimento* [$F(1,74) = 7,75$ ($p < 0,01$)].

O teste *post hoc* de Tukey mostrou diferença, no P31, do grupo PC comparado aos grupos CT e EA ($p < 0,001$), indicando que os animais com PC demoraram mais tempo para atravessar a escada horizontal do que os controles e os submetidos ao EA. O grupo PCEA demorou menos tempo para atravessar a escada horizontal quando comparados com o grupo PC, indicando um efeito preventivo do EA ($p < 0,001$) (Figura 8). No P52, os grupos EL e EAEL demoraram menos tempo para atravessar o aparato quando comparado ao grupo PC ($p < 0,05$). Assim como no dia P31, o grupo PCEA demorou menos tempo para cruzar o aparato quando comparado com o grupo PC ($p < 0,05$), indicando que o efeito preventivo do EA permaneceu com o passar do tempo (Figura 9).

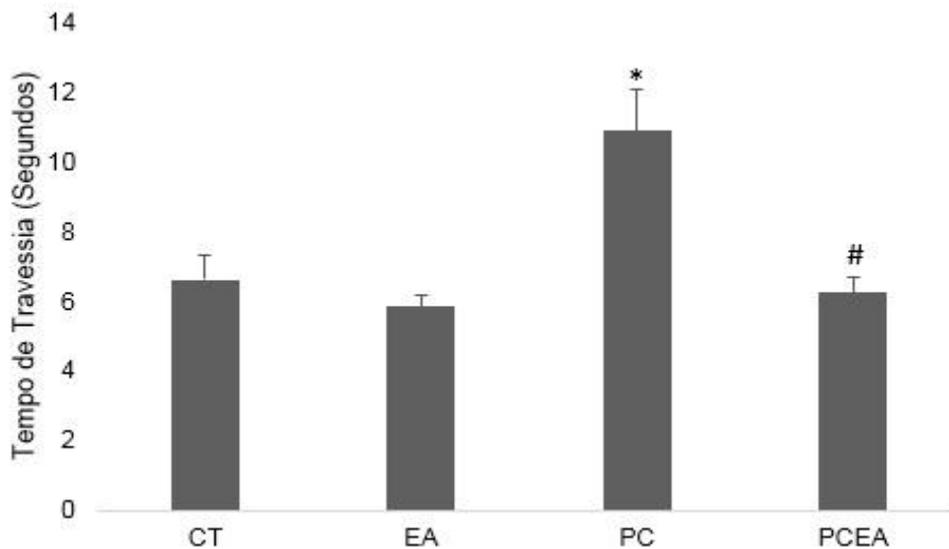


Figura 8. Tempo de travessia na escada horizontal no dia P31. Os dados estão expressos como média \pm EP. *Diferença do grupo PC comparado aos grupos CT e EA. #Diferença do grupo PC comparado ao grupo PCEA. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc Tukey, $p < 0,05$.

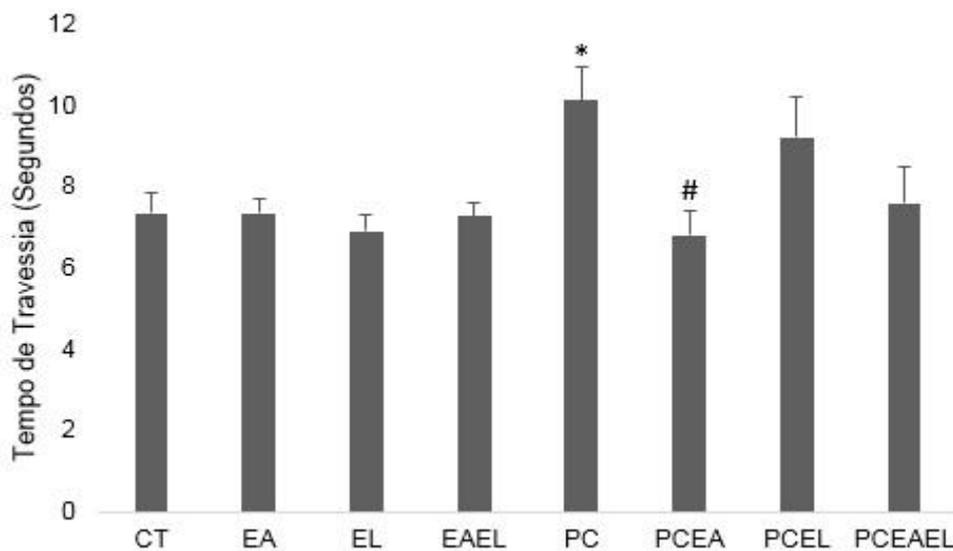


Figura 9. Tempo de travessia na escada horizontal no dia P52. Os dados estão expressos como média \pm EP. *Diferença do grupo PC comparado aos grupos EA e EAEL. #Diferença do grupo PC comparado ao grupo PCEA. Os resultados foram analisados por ANOVA de três vias seguida pelo teste post hoc Tukey, $p < 0,05$.

4.2.2 Escore de Erros

A ANOVA de duas vias mostrou que, no P31, houve diferenças significativas nos fatores *lesão* [$F(1,34) = 18,55$ ($p < 0,001$)] e *enriquecimento* [$F(1,34) = 10,53$ ($p < 0,001$)]. Também houve interação significativa entre os fatores *lesão X enriquecimento* [$F(1,34) = 6,02$ ($p < 0,05$)]. No P52, a nova de três vias mostrou diferença significativa no fator *lesão* [$F(1,74) = 45,25$ ($p < 0,001$)].

O teste *post hoc* de Tukey mostrou diferença, no P31, do grupo PC em relação aos grupos CT, EA e PCEA ($p < 0,001$), esse resultado, juntamente com os supracitados, reafirmam as alterações comportamentais geradas pelo modelo de PC utilizado e a prevenção das alterações motoras proporcionadas pelo enriquecimento ambiental (Figura 10).

No P52, observou-se diferença do grupo PC comparando com os grupos controle ($p < 0,001$), indicando a persistência das alterações motoras geradas pelo modelo com o passar do tempo. O grupo PCEA teve uma escore de erros maior do que os grupos EA, EL e EAEL ($p < 0,05$). Em contrapartida os grupos PCEL e PCEAEL não diferiram de nenhum grupo controle, sugerindo assim, que a estimulação locomotora possa ser um fator diferencial no padrão da marcha, já que o escore de erros avalia o número de erros por passos realizados (Figura 11).

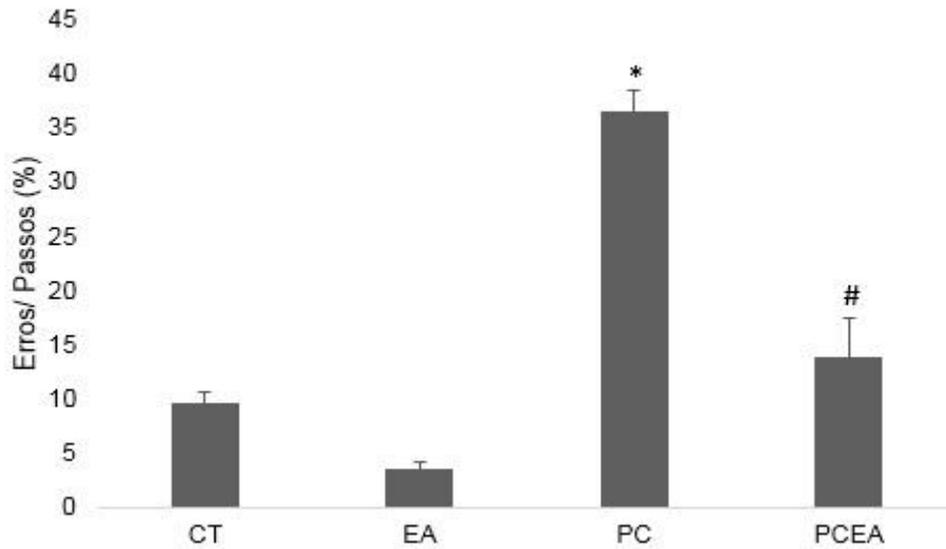


Figura 10. Escore de erros por passos no P31. Os dados estão expressos como média \pm EP. *Diferença do grupo PC comparado aos grupos CT e EA. #Diferença do grupo PC comparado ao grupo PCEA. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc Tukey, $p < 0,05$.

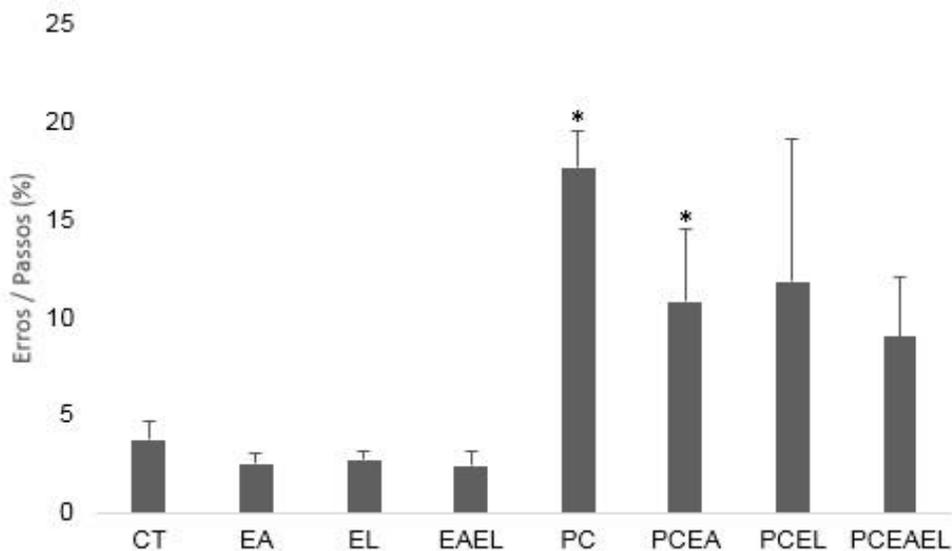


Figura 11. Escore de erros por passos no P52. Os dados estão expressos como média \pm EP. *Diferença do grupo PC comparado aos grupos controle e do grupo PCEA comparado aos grupos EA, EL e EAEL. Os resultados foram analisados por ANOVA de três vias seguida pelo teste post hoc Tukey, $p < 0,05$.

4.2 Análise do Músculo Tibial Anterior

A ANOVA de três vias mostrou que houve as seguintes interações significativas: *lesão X esteira* [$F(1,33) = 7,82$ ($p < 0,01$)], *enriquecimento X esteira* [$F(1,33) = 6,08$ ($p < 0,05$)] e *lesão X enriquecimento X esteira* [$F(1,33) = 4,79$ ($p < 0,05$)] na área média de secção transversal das fibras do músculo tibial anterior. O teste *pos hoc* de Tukey mostrou que o grupo PC apresentou uma área média das fibras do músculo tibial anterior menor do que as dos grupos CT, PCEA e PCEL ($p < 0,05$). A diferença entre o controle pode ser interpretada como uma atrofia muscular causada pelo modelo, atrofia essa que o EA e a EL, isoladamente, foram capazes de minimizar (Figura 12 e Figura 13).

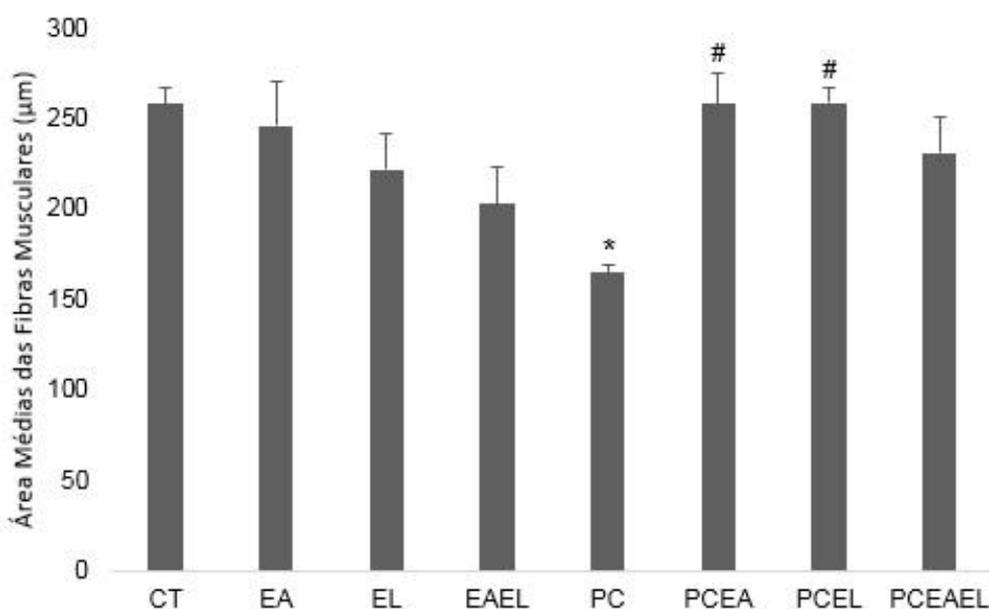


Figura 12. Média da área transversal das fibras musculares do músculo tibial. Os dados estão expressos como média \pm EP. *Diferença do grupo PC comparado o grupo CT. #Diferença dos grupos PCEA e PCEL comparado o grupo PC. ANOVA de três vias seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0.05$.

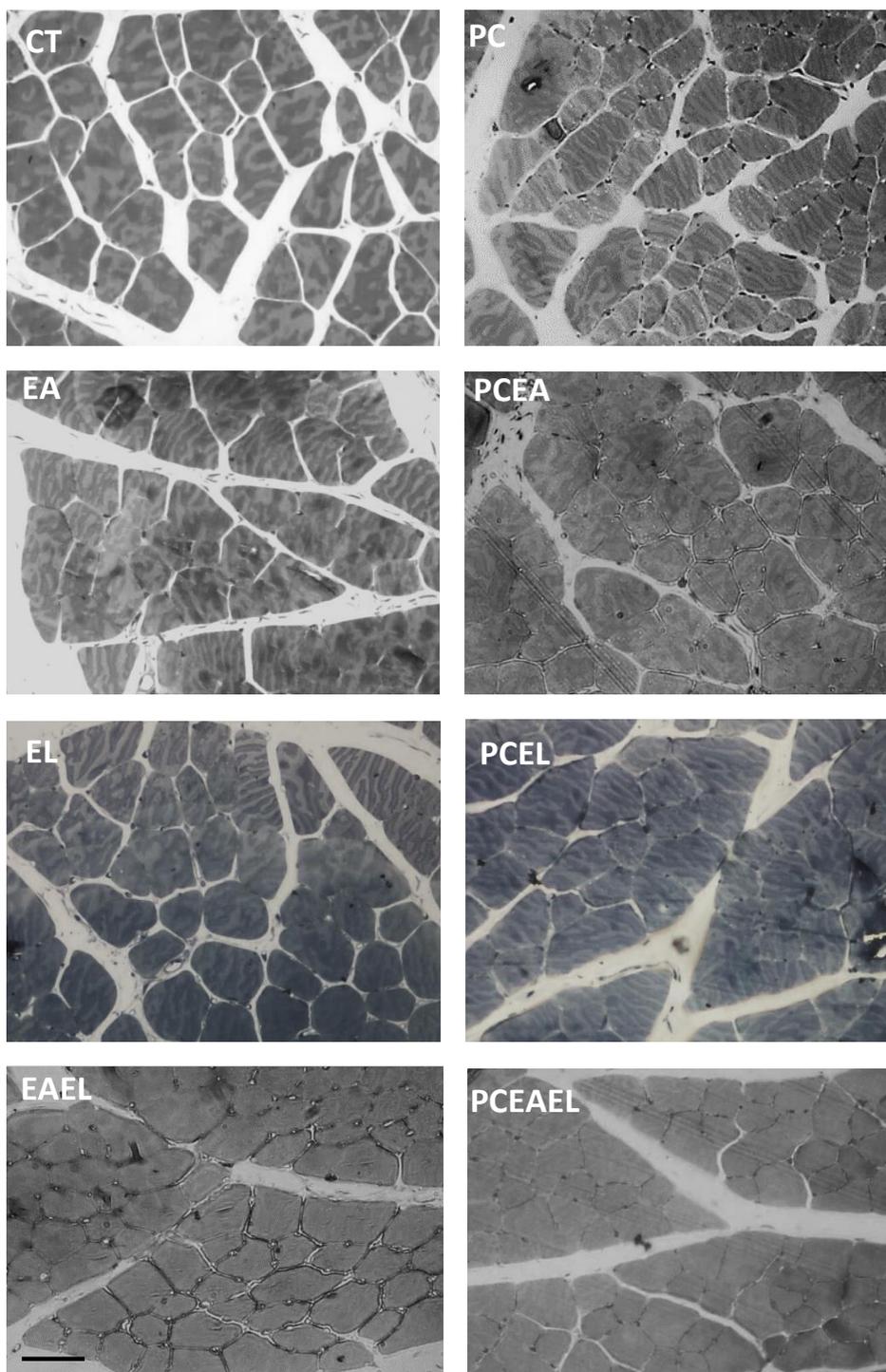


Figura 13. Imagens digitalizadas de cortes transversais semifinos ($1\ \mu\text{m}$) do músculo tibial anterior. A coluna da esquerda representa os grupos controle e da direita os grupos que foram submetidos ao modelo e seus respectivos tratamentos. Barra correspondente a $50\ \mu\text{m}$.

4.3 Análise do Músculo Sóleo

A ANOVA de três vias mostrou que houve diferença significativa no fator *lesão* [$F(1,36) = 46,25$ ($p < 0,001$)] e as seguintes interações significativas: *lesão X enriquecimento* [$F(1,36) = 8,71$ ($p < 0,01$)] e *lesão X esteira* [$F(1,36) = 15,84$ ($p < 0,001$)] na área de secção transversal média das fibras do músculo sóleo.

O teste *post hoc* de Tukey mostrou que o grupo PC apresentou uma menor área média do músculo sóleo quando comparado com os grupos CT, EA, EL e EAEL ($p < 0,001$), assim como o tibial anterior, esse resultado indica atrofia muscular gerada pelo modelo quando comparado aos grupos controle. O grupo PC também diferiu dos grupos PCEL ($p < 0,05$) e PCEAEL ($p < 0,01$), esses resultados mostram os benefícios da estimulação locomotora e associação dos tratamentos na minimização da atrofia muscular. Tendo em vista que não houveram diferenças entre o grupo PC e PCEA, a estimulação locomotora foi o fator determinante para a melhora do quadro atrofico (Figuras 14 e 15).

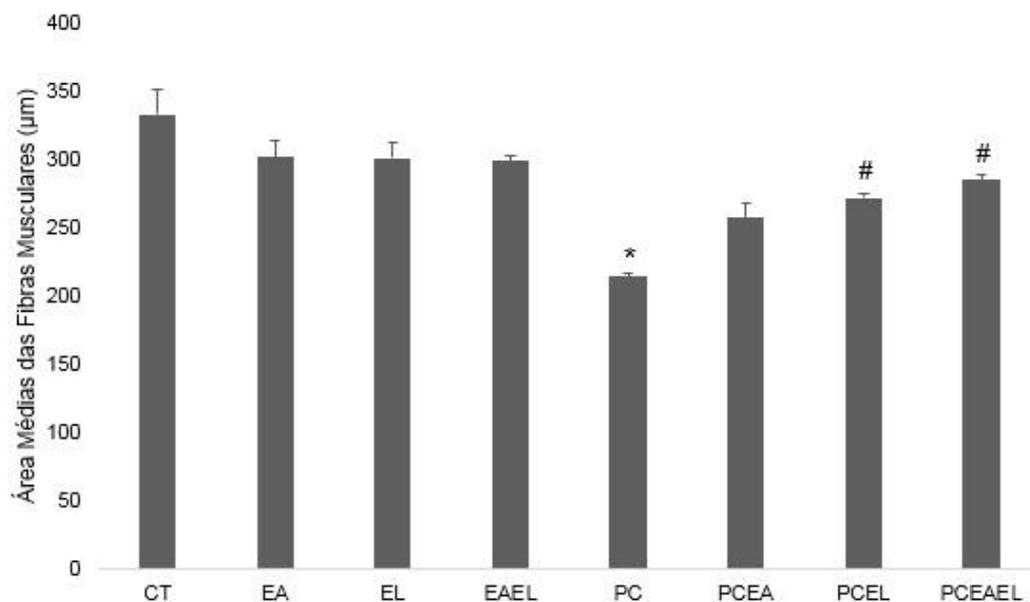


Figura 14. Média da área transversal das fibras musculares do músculo sóleo. Os dados estão expressos como média \pm EP. *Diferença do grupo PC comparado aos grupos controle. #Diferença do grupo PC comparado aos grupos PCEL e PCEAEL. ANOVA de três vias seguida de *post hoc* de Tukey, $p < 0.05$.

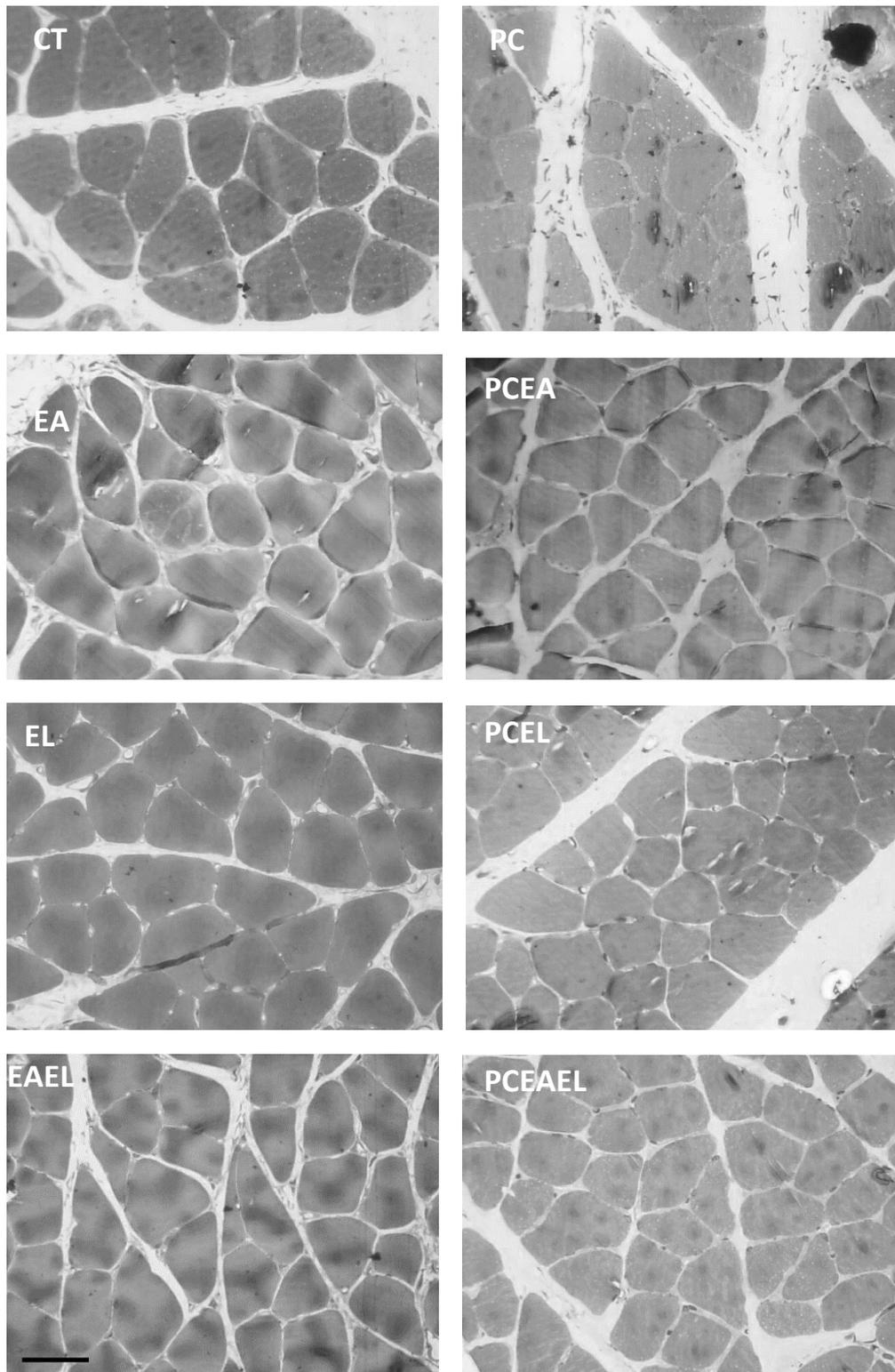


Figura 15. Imagens digitalizadas de cortes transversais semifinos ($1\ \mu\text{m}$) do músculo sóleo. A coluna da esquerda representa os grupos controle e da direita os grupos que foram submetidos ao modelo e seus respectivos tratamentos. Barra correspondente a $50\ \mu\text{m}$.

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o modelo de PC utilizado nesse estudo de fato gera alterações motoras importantes, como também foi capaz de proporcionar um quadro de atrofia muscular nos membros posteriores dos ratos, achados esses que são semelhantes aos de crianças com PC. O enriquecimento ambiental foi fundamental na prevenção da instalação das alterações comportamentais geradas pelo modelo, entretanto a EL mostrou ser o fator determinante na melhora do quadro de atrofia muscular gerada pelo modelo de paralisia cerebral.

Foi observado que o grupo PC teve o número médio de erros na barra estreita, o escore de erros x passos e o tempo de travessia na escada horizontal superior ao grupo CT e EA no P31. No P52, onde todos os oito grupos foram avaliados após o término dos tratamentos, observou-se que o grupo PC continuou a diferir dos controles nas avaliações comportamentais. Além disso, o grupo PC apresentou atrofia muscular tanto do músculo sóleo quanto do músculo tibial anterior. Assim, esses achados sugerem que o modelo, de fato, pode gerar alterações motoras importantes mimetizando o quadro motor debilitante do paciente com PC. Realmente, as crianças com paralisia cerebral apresentam alterações nos escores de escalas de avaliações motoras e modificações no tamanho, número e na ativação de fibras musculares, avaliado por biópsia muscular, ultrassonografia e eletromiografia (OHATA, et al., 2006; MARBINI, et al., 2002; GRAHAM; SELBER, 2003; LIEBER et al., 2003; PETERSEN, et al., 2002). STIGGER e cols. (2011), utilizando o mesmo modelo de PC utilizado nesse estudo,

observaram achados semelhantes aos mencionados. Vários modelos animais vêm sendo utilizados para mimetizar aspectos da paralisia cerebral, como o modelo de Levine, que utiliza a HI; e a associação de LPS com HI, ambas, gerando atrofias em importantes regiões encefálicas como hipocampo, córtex motor, corpo estriado e regiões subcorticais (LUBICS, et al., 2005; CLOWRY; CHAN, 2014; GIRARD, et al., 2008). Entretanto, as alterações motoras geradas por esses modelos são muito sutis e transitórias, não mimetizando o principal achado clínico apresentado pelos pacientes com PC que são as severas alterações motoras.

Há diversos tratamentos não farmacológicos que visam minimizar as alterações motoras geradas pela PC. Entre elas podemos citar o treinamento locomotor, integração sensorial, método Bobath, estimulação precoce, equoterapia, fisioterapia aquática e a tecnologia assistida. No entanto, observa-se na prática clínica a priorização inicial da estimulação precoce e integração sensorial, visando melhorar os *inputs* sensório-motores que irão ser alterados com o passar do tempo e repetição errônea de movimentos, e assim prevenir alterações musculoesqueléticas como contraturas, rigidez articular e diminuição da amplitude de movimento; e a associação das intervenções precoces com outras terapias para otimizar o tratamento do paciente de acordo com suas necessidades é o que comumente observado na prática clínica na reabilitação desses pacientes (HERSKIND, et al. 2014, MAJNEMER, 1998; BLAUW-HOSPERS; HADDERS-ALGRA, 2005).

O EA pode ser considerado uma intervenção terapêutica global para roedores que irá envolver atividade física, interação social e experiências de aprendizagem (PLANE, et al., 2008). Já a estimulação locomotora em ratos pode ser considerada análoga ao treinamento locomotor em humanos, visando promover uma marcha mais independente, aumentar amplitude de movimento nos membros inferiores e melhorar a qualidade de vida desses pacientes (SWE, et al., 2014).

O EA foi capaz de prevenir e minimizar as alterações motoras geradas pelo modelo, além de atenuar a atrofia do músculo tibial anterior. Podemos visualizar assim um efeito preventivo do EA realizado no período de indução do modelo nas alterações motoras observadas. Essa prevenção pode estar relacionada com a ampla variedade de estímulos presentes no EA que proporcionou exploração maior ao ambiente, interação social contínua, estimulação sensorial e motora voluntária, entre outros benefícios apresentados pelo EA. Marques e cols. (2014), observaram resultados semelhantes nos testes comportamentais, entretanto não foram observadas alterações significativas na área média do músculo sóleo, como no nosso estudo, e o tibial anterior não foi avaliado. Esses resultados também se assemelham a dados encontrados em trabalhos realizados com outras patologias, nos quais o enriquecimento ambiental se mostrou capaz de restaurar habilidades motoras semelhantes as observadas em nosso estudo (RISEDAL et al, 2002; KLINE et al., 2007; HOFFMAN et al, 2008).

A EL sozinha e o EA associado com a EL não foram capazes de reverter as alterações motoras comportamentais geradas pelo modelo. No escore de

erros na escada horizontal pode-se observar que os grupos PCEL e PCEAEL não diferiram dos grupos controle, o que não foi observado com os grupos PC e PCEA, sugerindo um possível benefício da associação das terapias nesse teste. Em relação a atrofia do músculo sóleo, o resultado foi benéfico, indicando efeito positivo da estimulação locomotora e da associação de tratamentos.

Contudo, mesmo após a estimulação locomotora, o grupo PCEL continuou apresentando atrofia em relação ao grupo CT, o que não foi observado no grupo PCEAEL. Por fim, foi observado que o grupo PCEA não diferiu do seu respectivo controle (grupo EAEL), como também não diferiu do grupo PC, mostrando que o EA isoladamente não foi eficaz na reversão ou diminuição da atrofia muscular do músculo sóleo. Assim, podemos interpretar que a associação das duas terapias é mais benéfica do que ambas separadamente na diminuição da atrofia muscular.

Marcuzzo e cols. (2008), utilizando a estimulação locomotora como terapia isolada em um modelo de PC semelhante (anóxia perinatal e restrição sensório-motora nos membros posteriores), observaram recuperação da atrofia do músculo sóleo. Utilizando o mesmo modelo que foi empregado no nosso estudo, Marques e cols. (2014), também não observaram melhora na atrofia muscular no grupo PC exposto somente ao EA.

Protocolos de treinamento locomotor em crianças com PC (Damiano, 2006 e Willerslev-Olsen *et al.*, 2015), demonstraram, através de escalas motoras específicas para função dos músculos dorsi-flexores e

eletromiografia de superfície, respectivamente, que os protocolos de treinamento locomotor utilizados foram benéficos no recrutamento muscular do tibial anterior e sóleo, e na amplitude do movimento da articulação do tornozelo. Em estudo recente Swe e cols. (2015), observaram que o treinamento locomotor promoveu um aumento da velocidade da marcha, melhora do teste de caminhada de 6 minutos e benefícios na função motora grossa em humanos. Dessa forma, podemos perceber que os benefícios da estimulação locomotora são equivalentes aos observados no treinamento locomotor utilizado na reabilitação de pacientes com paralisia cerebral.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo faz parte de uma gama de experimentos desenvolvidos com o intuito de estudar os mecanismos biológicos das terapias comumente utilizadas na reabilitação de pacientes com paralisia cerebral. Em estudos anteriores, foram observados os efeitos gerados pelo modelo de PC a nível medular e muscular, e foram estudados os efeitos isolados da EL e do EA precoce. Porém, na prática clínica, as crianças com PC são submetidas à fisioterapia desde o diagnóstico e por um grande período de suas vidas. Assim, os tratamentos são iniciados o mais precocemente possível e são alterados com o passar do tempo e de acordo com a evolução do paciente. No intuito de simular mais proximamente o que ocorre na prática, combinamos os dois tratamentos, estimulação locomotora e enriquecimento ambiental, a fim de estudar os efeitos isolados e da sua associação no modelo de PC.

Foi observado que o enriquecimento ambiental foi bastante eficaz na prevenção das alterações motoras e que a estimulação locomotora e a associação de tratamentos foram importantes na minimização das alterações histológicas geradas pelo modelo.

Esse resultado reflete o que é observado na prática clínica, na qual crianças com PC estimuladas e tratadas precocemente, tem alterações motoras mais brandas das que não tratadas nessa abordagem. Outro achado semelhante ao observado na clínica são os benefícios gerados

pelo treinamento locomotor na diminuição da atrofia muscular dos músculos responsáveis pela deambulação.

Estudos adicionais devem ser realizados a fim de se elucidar e compreender melhor outros mecanismos biológicos envolvidos nessas terapias realizadas de forma isolada e associada.

7. PERSPECTIVAS

Esse modelo de paralisia cerebral já vem sendo utilizado em nosso laboratório, assim como intervenções comumente utilizadas na prática clínica. Entretanto ainda há lacunas no que se diz respeito a alterações geradas por esse modelo, como também na elucidação dos mecanismos biológicos gerados pelos tratamentos já utilizados.

Dessa forma, pretendemos observar os efeitos do modelo sobre o tecido ósseo. As tíbias dos animais serão pesadas em balança de alta precisão e passarão por avaliações morfométricas (comprimento total do osso, da epífise proximal e distal, e da diáfise). A epífise proximal da tíbia será corada com hematoxilina-eosina a fim de observar o número médio de osteoclastos.

Os músculos tibial anterior e sóleo, serão submetidos à análise de distribuição de frequência do tamanho das fibras musculares, a fim de observar possíveis discrepâncias entre os tamanhos das fibras musculares entre os grupos estudados.

Será observada a expressão da sinaptofisina através de imunohistoquímica do corno ventral da medula espinhal, do córtex motor M1 e corpo estriado, com a finalidade de verificar possíveis alterações entre os grupos no que se refere a plasticidade sináptica.

Por fim, através de um protocolo que utiliza o Dil (marcador fluorescente lipofílico) iremos verificar os tipos, porcentagem e densidade de espinhos

dendríticos encontrados no córtex motor M1 e no corpo estriado, que servirão como indicadores de neuroplasticidade.

8. REFERÊNCIAS

AMBROSE N, WADHAM J, MORTON D. Refinement of euthanasia. In: Progress in the Reduction, Refinement and Replacement of Animal Experimentation (Balls M, Zeller A-M, Halder ME, eds). Amsterdam: **Elsevier**. 2000; 1159–70.

BENGOETXEA H, ORTUZAR N, RICO-BARRIO I, LAFUENTE J, ARGANDONÁ EG. Increased physical activity is not enough to recover astrocytic population from dark-rearing. Synergy with multisensory enrichment is required. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. 2013;170(7).

BLAUW-HOSPERS CH, HADDERS-ALGRA M. A systematic review of the effects of early intervention on motor development. **Developmental Medicine & Child Neurology**. 2005;47: 421-423.

BRAZIL. Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. **Diretrizes da Prática da Eutanásia do**. Brasília. 2013

CAHILL-ROWLEY K, ROSE J. Etiology of impaired selective motor control: merging evidence and its implications for research and treatment in cerebral palsy. **Developmental Medicine and Child Neurology**. 2013; 56: 522-528.

CALLAGHAN ME, MACLENNAN AH, GIBSON CS, MCMICHAEL GL, HANN EA, BROADBENT JA, GOLDWATER PN, DEKKER GA. Epidemiologic Associations With Cerebral Palsy. **OBSTETRICS & GYNECOLOGY**. 2011;118(3): 576-580.

CHRYSAGIS N, SKORDILIS EK, STAVROU N, GRAMMATOPOULOU E, KOUTSOUKI D. The Effect of Treadmill Training on Gross Motor Function and Walking Speed in Ambulatory Adolescents with Cerebral Palsy. **American Journal of Physical Medicine Rehabilitation**. 2012;91(9): 747-756.

CLOWRY G J, BASUODAN R, CHAN F. What are the best animal models for testing early intervention in cerebral palsy? **Frontiers in Neurology**. 2014;5 (258): 1-17.

COQ JO, STRATA F, RUSSIER M, SAFADI FF, MERZENICH MM, BYL NN, BARBE MF. Impacto of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: Implications for cerebral palsy. **Experimental Neurology**. 2008;210: 95-108.

DAMMAN O, HAGBERG H, LEVITON A. Is periventricular leukomalacia in axonopathy as well as an oligopathy? **Pediatr Res**. 2001;49: 453-457.

DAMIANO DL. Activity, activity, activity: rethinking our physical therapy approach to cerebral palsy. **Physical Therapy**. 2006;86: 1534-1540.

FOLKERTH R D. Neuropathologic substrate of cerebral palsy. **Journal of Child Neurology**. 2005;20(12): 940-9.

GILBERT WM, JACOBY BN, XING G, DANIELSEN B, SMITH LH. Adverse Obstetrical Events are Associated with Significant Risk of Cerebral Palsy. **American Journal of Obstetric Gynecology**. 2005;203(4): 328.e1–328.e5.

GIRARD S, KADHIM H, BEAUDET N, SARRET P, SÉBIRE G. Developmental motor deficits induced by combined fetal exposure to lipopolysaccharide and early neonatal hypoxia/ischemia: A novel animal model for cerebral palsy. **Neuroscience**. 2008;23: 673-682.

GRAHAM HK, SELBER P. Musculoskeletal aspects of cerebral palsy. **J The Bone and Joint Journal**. 2003;85: 157-66

GRECCO LAC, TOMITA SM, CHRISTOVÃO TCL, PASINI H, SAMPAIO LMM, OLIVEIRA CS. Effect of treadmill gait training on static and functional balance in children with cerebral palsy: a randomized controlled trial. **Brazilian Journal of Physical Therapy**. 2013;17(1):17-23.

HAMILTON GF, ET AL. Exercise and Environment as an Intervention for Neonatal Alcohol Effects on Hippocampal Adult Neurogenesis and Learning. **Neuroscience**. 2014; 265: 274-290.

HERSKIND A, GREISEN G, NIELSEN JB. Early identification and intervention in cerebral palsy. **Developmental Medicine & Child Neurology**. 2014: DOI: 10.1111/dmcn.12531.

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

HOEGER H, ET AL. Long Term Neurological and Behavioral Effects of Graded Perinatal Asphyxia in the Rat. **Life Sic**. 2000;66: 947-962.

HOFFMAN AN, ET AL. Environmental enrichment-mediated functional improvement after experimental traumatic brain injury is contingent on task-specific neurobehavioral experience. **Neuroscience Letters**. 2008;431: 226-230.

HWAJA O, VOLPE J J. Pathogenesis of cerebral white matter injury of prematurity. **Archive of Diseases in Childhood Fetal and Neonatal**. 2008; 93(2): 153-161.

JADAVJI NM, KOLB B, METZ GA. Enriched Environment Improves Motor Function. **Neuroscience**. 2006; 140: 1127-1138.

JAN MMS. INTACT AND UNILATERAL DOPAMINE-DEPLETED RATS. Cerebral Palsy: Comprehensive Review and Update. **Annals of Saudi Medicine**. 2006;26(2):123-132.

JANKOWSKY JL, MELNIKOVA T, FADALE DJ, XU GM, SLUNT HH, GONZALES V, YOUNKIN LH, YOUNKIN SG, BORGCHELT DR, SAVONENKO AV. Environmental enrichment mitigates cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Neuroscience**. 2005;25(21): 5217-5224.

JANSEN E M, LOW W C. Long-term Effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. **Behavior Brain Research**. 1996;78: 189-194.

JOHNSTON M V, HOON J R A H. Cerebral palsy. **Neuromolecular Medicine** 2006;8: 435-50.

KEOGH JM, BADAWI N. The origins of cerebral palsy. **Current Opinion in Neurology**. 2006;19:129–134.

KLINE AE, MCALOON RL, HENDERSON KA, BANSAL UK, GANTI BM, AHMED, RH, GIBBS RB, SOZDA CN. Evaluation of a combined therapeutic regimen of 8-OH-DPAT and environmental enrichment after experimental traumatic brain injury. **Journal of Neurotrauma**. 2010;12: 289-298.

KNOW TG, YI SH, KIM TW, CHANG HJ, KNOW JY. Relationship Between Gross Motor Function and Daily Functional Skill in Children With Cerebral Palsy. **Annals of Rehabilitation Medicine**. 2013;37(1):41-49.

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

KRIGGER K W. Cerebral palsy: an overview. **American Family Physician**. 2006;73: 91-100.

LAROUCHE A, ROY M, KADHIM H, TSANACLIS AM, FORTIN D, SEBIRE G. Neuronal injuries induced by perinatal hypoxic-ischemic insults are potentiated by prenatal exposure to lipopolysaccharide: animal model for perinatally acquired encephalopathy. **Development Neuroscience**. 2005;27:134–142.

LIEBER LR, et al., INFERIOR MECHANICAL PROPERTIES OF SPASTIC MUSCLE BUNDLES DUE TO HYPERTROPHIC BUT COMPROMISED EXTRACELLULAR MATRIX MATERIAL. **Muscle Nerve**. 2003;28: 464–471, 2003

LLORENS-MARTIN MV, RUEDA N, MARTÍNEZ-CUÉ C, TORRES-ALEMÁN I, FLÓREZ J, TREJO JL. Both increases in immature dentate neuron number and decreases of immobility time in the forced swim test occurred in parallel after environmental enrichment of mice. **Neuroscience**. 2007;147(3): 631-638.

LUBICS A, REGLÖDI D, TAMÁS A, KISS P, SZALAI M, SZALONTAY L, LENGVÁRI I. Neurological Reflex and Early Motor Behavior in Rats Subjects to Neonatal Hypoxic-Ischemic Injury. **Behavior Brain Research**. 2005; 157: 157-161.

MARCUZZO S, DUTRA MF, STIGGER F, NASCIMENTO PS, ILHA J, KALIL-GASPAR PI, ACHAVAL M. Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy like rodent model: walkin pattern and soleus quantitative histology. **Brain Research**. 2008;1222: 129-140.

MARCUZZO S, DUTRA MF, STIGGER F, NASCIMENTO PS, ILHA J, KALIL-GASPAR PI, ACHAVAL M. Different effects of anoxia and limb-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory córtex in rats. **Brain & Development**. 2010;32:323-31.

MARQUES RM, STIGGER F, SEGABIZNAZI E, AUGUSTIN OA, BARBOSA S, PIAZZA FV, ACHAVAL M, MARCUZZO S. Beneficial effects of early environmental enrichment on motor development and spinal cord plasticity in a rat model of cerebral palsy. **Behavior Brain Reserach**. 2014;263: 149-157.

MATHEWSON M A, LIEBER R L. Pathophysiology of Muscle Contractures in Cerebral Palsy. **Physical Medicine & Rehabilitation Clinics of North America**. 2015;26: 57-67.

METZ GA, WHISHAW IQ. The Ladder Rung Walking Task: A Scoring System and its Practical Application. 2009; **JoVE**. 28. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1204>, doi: 10.3791/1204

METZ GA, WHISHAW IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination. **Journal of Neuroscience Methods**. 2002;115: 169-179.

NITHIANANTHARAJAH J, HANNAN AJ. Enriched environments, experience dependent plasticity and disorders of the nervous system. **Nature Reviews**. 2006;7: 697-709.

OSKOU M, JOSEPH L, DAGENAIS J, SHEVELL M. Prevalence of Cerebral Palsy in Quebec: Alternative Approaches. **Neuroepidemiology**. 2013;40:264–268.

PAIVA FP, MAFFILI VV, SANTOS ACS. Curso de Manipulação de Animais de Laboratório. **Fiocruz**. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Salvador – BA (2005).

PAVÃO SL, SANTOS AN, WOOLLACOTT MH, ROCHA NACF. Assessment of postural control in children with cerebral palsy: A review. **Research in Developmental Disabilities**. 2013; 34: 1367–1375.

PEREIRA LO, ARTENI NS, PETERSEN RC, ROCHA AP, ACHAVAL M, NETTO CA. Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. **Neurobiology of learning and memory**. 2007;87:101-108.

PETERSON H T, et al., Failure of normal development of central drive to ankle dorsiflexors relates to gait deficits in children with cerebral palsy. **Journal of Neurophysiology**. 2013; 109:625–639.

PIAZZA FV, PINTO GV, TROTT G, MARCUZZO S, GOMEZ R, FERNANDES MC. Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. **Behavioral Brain Research**. 2011;217: 16-20.

RICHARDS LC, MALOUIN F, DUMAS F, MARCOUX F, LEPAGE C, MENIER C. Early and Intensive Treadmill Locomotor Training for Young Children with Cerebral Palsy: A Feasibility Study. **Pediatric Physical Therapy**. 1997;9: 158-165.

ROSEMBAUM P, PANETH N, LEVITON A, GOLDSTEIN M, BAX M, DAMIANO D, DAN B, JACOBSSON B. A report: the definition and classification of cerebral palsy [Erratum in: Dev Med Child Neurol. 49: 480 (2007)]. **Development Medicine and Child Neurology Suppl**. 2007;109: 8-14.

SINGHAL G, JAEHNE EJ, CORRIGAN F, BAUNE BT. Cellular and molecular mechanisms of immunomodulation in the brain through environmental enrichment. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. 2014;8 (97).

STANLEY FJ, BLAIR E, ALBERMAN E. Cerebral palsies: epidemiology and causal pathways. **London: Mac Keith Press**. 2000

STIGGER F, FELIZZOLA ALS, KRONBAUER GA, COUTO GK, ACHAVAL M, MARCUZZO S. Effects of fetal exposure to lipopolysaccharide, perinatal anoxia and sensorimotor restriction on motor skills and musculoskeletal tissue: Implications for an animal model of cerebral palsy. **Experimental Neurology**. 2011a;228: 183-91.

STIGGER F, NASCIMENTO PS, DUTRA MF, COUTO GK, ILHA J, ACHAVAL M, MARCUZZO S. Treadmill training induces plasticity in spinal motoneurons and sciatic nerve after sensorimotor restriction during early postnatal period: New insights into the clinical approach for children with cerebral palsy. **International Journal of Developmental Neuroscience**. 2011b; 29: 833-3.

STRATA F, COQ JO, BYL N, MERZENICH MM. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: implications for a rodent model of cerebral palsy. **Neuroscience**. 2004;129: 141-156.

SWE N N, et al. Over ground walking and body weight supported walking improve mobility equally in cerebral palsy: A randomised controlled trial. **Clinical Rehabilitation**. 2015; 1- 9 (DOI: 10.1177/0269215514566249).

OHATA et al., Measurement of Muscle Thickness as Quantitative Muscle Evaluation for Adults With Severe Cerebral Palsy. **Physical Therapy**. 2006; 86-9.

VAN PRAAG H, KEMPERMANN G, GAGE FH. Neural Consequences of Environmental Enrichment. **Nature Reviews**. 2000; 1: 191-198.

VOLPE J J. Cerebral White Matter Injury of the Premature Infant—More Common Than You Think. **PEDIATRICS**. 2003;112(1):176-180.

WILLERSLEV-OLSEN M, PETERSEN TH, FARMER SF, NIELSEN JB. Gait training facilitates central drive to ankle dorsiflexors in children with cerebral palsy. **Brain**. 2015;138; 589-603.

WILLOUGHBY KL, DODD JK, SHIELDS N. A systematic review of the effectiveness of treadmill training for children with cerebral palsy. **Disability and Rehabilitation**. 2009; 31(24): 1971–1979.

WU CS, PEDERSEN LH, MILLER JE, SUN Y, STREJA E, ULDALL P, OLSEN J. Risk of Cerebral Palsy and Childhood Epilepsy Related to Infections before or during Pregnancy. **Prenatal Infections and Mental Disorder**. 2013;8(2): 1-7.

XU M, ET AL., Effects of Perinatal Lipopolysaccharide (LPS) Exposure on the Developing Rat Brain; Modeling the Effect of Maternal Infection on the Developing Human CNS. **Cerebellum**. 2013;9.