



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA
MESTRADO EM FISIOTERAPIA

**MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL:
IMPLICAÇÕES DA DESNUTRIÇÃO PERINATAL SOBRE ATIVIDADE
LOCOMOTORA E METABOLISMO PROTEICO MUSCULAR EM
RATOS**

KÁSSIA DE OLIVEIRA GOMES DA SILVA

RECIFE

2015

KÁSSIA DE OLIVEIRA GOMES DA SILVA

**MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL:
IMPLICAÇÕES DA DESNUTRIÇÃO PERINATAL SOBRE ATIVIDADE
LOCOMOTORA E METABOLISMO PROTEICO MUSCULAR EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do grau de Mestre em Fisioterapia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Elisa Toscano

Co-orientador: Prof. Dr. Raul Manhães de Castro

RECIFE

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1662

S586m Silva, Kássia de Oliveira Gomes da.
Modelo experimental de paralisia cerebral: implicações da
desnutrição perinatal sobre atividade locomotora e metabolismo proteico
muscular em ratos / Kássia de Oliveira Gomes da Silva. – Recife: O
autor, 2015.
89 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Ana Elisa Toscano.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, 2015.
Inclui referências e anexos.

1. Paralisia cerebral. 2. Desnutrição. 3. Anoxia. 4. Atividade
locomotora. 5. Ratos I. Toscano, Ana Elisa (Orientadora). II. Título.

615.8 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2015-125)

“MODELO EXPERIMENTAL DE PARALISIA CEREBRAL: IMPLICAÇÕES DA DESNUTRIÇÃO PERINATAL SOBRE ATIVIDADE LOCOMOTORA E METABOLISMO PROTEICO MUSCULAR EM RATOS”.

KÁSSIA DE OLIVEIRA GOMES DA SILVA

APROVADA EM: 27/02/2014

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ANA ELISA TOSCANO MENESES DA SILVA CASTRO

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF^a. DR^a. – KARLA MÔNICA FERRAZ TEIXEIRA LAMBERTZ - FISIOTERAPIA/UFPE

PROF^a. DR^a. RAQUEL DA SILVA ARAGÃO – NÚCLEO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E CIÊNCIAS DO ESPORTE DO CAV/UFPE

PROF^a. DR^a. SANDRA LOPES DE SOUZA - DEPARTAMENTO DE ANATOMIA DO CCB/UFPE

Visto e permitida à impressão

Coordenadora do PPGFISIOTERAPIA/DEFISIO/UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS - GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA

Profa. Angélica da Silva Tenório

COORDENADOR DO MESTRADO EM FISIOTERAPIA

Profa. Daniella Araújo de Oliveira

VICE - COORDENADOR DO MESTRADO EM FISIOTERAPIA

Profa. Karla Mônica Ferraz Teixeira Lambertz

RECIFE

2015

Dedico este trabalho, com muito amor, aos que estiveram comigo em todos os momentos, me apoiando e dando forças para seguir em frente. Em especial ao meu pai, João Gomes da Silva Neto, e minha mãe, Cláudia Jane de Oliveira Gomes da Silva, que acreditam sempre no meu potencial e não me deixam esmorecer; e meu maravilhoso esposo e amigo, Luciano Clemente da Silva, a quem eu também devo muito do meu aprendizado como pesquisadora e que está sempre comigo principalmente nas horas mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, preciso agradecer a **Deus**, pelo seu infinito amor, por jamais me abandonar e estar sempre me dando forças para continuar.

À **Minha família**, em especial meus pais, **João Gomes da Silva Neto** e **Cláudia Jane de Oliveira Gomes da Silva**, meus avós **Ivonilda Dantas de Oliveira**, **Jorge Lopes de Oliveira** e **Dolores Gonçalves** (*in memorian*) por todo o incentivo, amor, apoio, pela dedicação, paciência e torcida constantes, me fazendo acreditar nos meus objetivos e na minha capacidade de alcançá-los.

Ao meu esposo, amigo e grande incentivador, **Luciano Clemente da Silva**, por estar sempre ao meu lado me ensinando, apoiando, compreendendo, ajudando, compartilhando conhecimentos e alegrias e por amenizar momentos de tristeza e difíceis, me dando sempre uma razão para seguir em frente e fazendo minha vida cada dia melhor.

Aos meus sogros e pais de coração, **Amélia Clemente da Silva** e **Leuvino Clemente da Silva**, também pela torcida sempre presente.

À **Sabrina Pereira**, estudante de Iniciação Científica, pelo empenho e competência em todo o processo de desenvolvimento deste trabalho, o qual foi imprescindível para que tudo desse certo. Confio em você de olhos fechados! E a **Ana Paula (Peu)**, pela disponibilidade em me socorrer sempre que precisei!

Aos amigos do laboratório, em especial à **José Antônio Santos** e **Diego Lacerda**, pelos momentos de conversa, descontração, conselhos mútuos, ajuda e amizade; E aos amigos do **Laboratório de Fisiologia** (**Polyana, Jéssica, Dijannah, Falu, Prof. Valdir**), onde fui 'adotada' como integrante do 'Lab' e que sempre me receberam com um sorriso no rosto e um abraço. Vocês fizeram parte dessa conquista!!

Às minhas amigas do **Liceu de Artes e Ofícios** e da **graduação em Fisioterapia**, que não deixam a distância diminuir nossa amizade, me proporcionando inúmeros momentos de alegrias e tornando minha vida mais doce; Além do **Tempus Ministério de Música**, que compreenderam nossos (meu e do meu esposo) vários momentos de ausência devido aos compromissos com os animais.

À **Gabriela Almeida, Marcelly Kellyane e Bárbara Barros**, com quem pude aprender muito nesses dois anos de Mestrado e recebi muitos auxílios e conselhos

nas horas em que estive ‘perdida’, além dos momentos de descontração essenciais nesse período.

Aos meus orientadores, Prof^a Dr^a **Ana Elisa Toscano** e Prof. Dr. **Raul Manhães de Castro**, por todos os ensinamentos, paciência e conselhos. Em especial à Ana Elisa, por ter me incentivado e ajudado muito no período em que estive dedicada à realização de um grande sonho: Tornar-me professora do Departamento de Anatomia da UFPE.

À Prof^a Dr^a **Simone Marcuzzo** e à MSc **Marília Marques**, pesquisadoras da UFRGS e que, com toda a disponibilidade e paciência e sem ao menos me conhecerem pessoalmente, me auxiliaram à distância, através de vários e-mails, para a confecção das órteses de epóxi. Sem essa ajuda, seria muito mais difícil chegarmos aos procedimentos e moldagem corretos para a restrição dos animais.

Às pesquisadoras do Laboratório de Distúrbios do Metabolismo da Unicamp, **Mariana Portovedo** e **Marciane Milanski**, pela disponibilidade e auxílio no desenvolvimento de algumas etapas do trabalho.

Aos **professores e amigos do Departamento de Anatomia da UFPE**, em especial à **Fernanda Villarouco**, **Lígia Galindo** e **Renata Campina**, que sempre me motivam com suas conversas e experiências; e também em especial (e principalmente) à **Sandra Lopes de Souza**, minha “mãe acadêmica”, pelos ouvidos e palavras de incentivo sempre disponíveis e incansáveis, apoio incondicional em todas as minhas decisões, confiança no meu potencial e amizade.

Aos **docentes da Pós-graduação em Fisioterapia**, pelo conhecimento que nos foi transmitido.

À **Niège**, **Carol** e **Rafael**, da secretaria da Pós-graduação, pela competência em suas atividades e socorro sempre que necessitei.

À **Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)** pelo apoio financeiro.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

RESUMO

A Paralisia Cerebral (PC) é uma das maiores causas de disfunção motora crônica na infância e a desnutrição no período de gestação e lactação é caracterizada por apresentar danos aos circuitos neurais, com efeitos no crescimento e comportamento alimentar e deficiências na musculatura esquelética. A PC e a desnutrição podem estar associadas em populações de países subdesenvolvidos, onde a oferta de nutrientes é escassa e a quantidade de crianças com PC é expressiva. O objetivo deste estudo foi verificar, em um modelo de paralisia cerebral experimental, o efeito da desnutrição sobre a atividade locomotora e o metabolismo de proteínas miofibrilares (MuRF-1 e Atrogin-1). Ratas gestantes foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: Normonutrido (N, n=9) e Desnutrido (D, n=12). Após o nascimento, os filhotes foram subdivididos em quatro grupos experimentais: Normonutrido Controle (NC, n=16), Normonutrido PC (NPC, n=21), Desnutrido Controle (DC, n=20) e Desnutrido PC (DPC, n=18). Os animais dos grupos com Paralisia Cerebral foram submetidos à anóxia perinatal no dia do nascimento (P0) e no dia seguinte (P1) com fluxo de 9l/min de Nitrogênio (N₂ 99,9%) por um período de 12 minutos cada dia, e à Restrição sensório-motora do 2º ao 28º dia de vida pós-natal (P2 ao P28), utilizando uma órtese de epóxi presa ao quadril do animal, por um período de 16 horas cada dia, de modo a manter suas patas posteriores estendidas. A atividade locomotora dos animais de todos os grupos foi analisada aos 8, 14, 17, 21 e 28 dias de vida pós-natal. Aos 29 dias foram coletados os músculos sóleos dos animais para análise de proteínas miofibrilares MuRF-1 e Atrogin-1. Animais com PC apresentaram redução do peso corporal ($p<0,001$) e piora de vários parâmetros da atividade locomotora ($p<0,05$) comparando com seu grupo controle. A desnutrição reduziu o peso corporal ($p<0,05$), a potência média e o gasto de energia ($p<0,05$) e a massa muscular do Sóleo ($p<0,001$). A Expressão de Atrogin-1 não se mostrou alterada em nenhum grupo enquanto a de MuRF-1 esteve aumentada no grupo DPC. A PC promove atrofia muscular e diminuição da locomoção. Quando associada à desnutrição, a atrofia muscular é acompanhada de aumento da degradação proteica muscular.

Palavras-chave: Paralisia Cerebral. Desnutrição. Anoxia. Atividade Locomotora. Ratos.

ABSTRACT

Cerebral Palsy (CP) is the major cause of motor dysfunction in children and malnutrition in gestational and lactational periods is characterized by neural circuits, with effects in growth and food behavior and disabilities in skeletal muscle. CP and malnutrition may be associated in populations of underdeveloped countries, where the supply of nutrients is scarce and the number of children with CP is significant. The aim of this study was verify in a rodent model of cerebral palsy the effect of malnutrition on locomotor activity and myofibrillar proteins metabolism (MuRF-1 and Atrogin-1). Pregnant rats were divided in two groups according to diet offered: Nourished group (N) and Malnourished group (D). After birth, pups was divided in four groups: Nourished control group (NC), Nourished CP group (NCP), malnourished group (DC) and malnourished CP group (DCP). Animals of CP groups was submit to perinatal anoxia at birth day (P0) and the next day (P1) by Nitrogen (N₂ 99,9%) at 9l/min of flow during 12 minutes each day, and to Sensoriomotor restriction from 2th to 28th postnatal day (P2 to P28) using an orthosis of epoxy attached to the animals' hip during 16 hours per day for maintenance his hindlimbs in extension. The locomotor activity of all four groups animals was analyzed at 8, 14, 17, 21 and 28 postnatal days. At 29 days was collected soleus muscle for analyzes of myofibrillar proteins MuRF-1 and Atrogin-1. Animals with CP showed reduction to body weight ($p<0,001$) and worsening of various parameters of locomotor activity ($p<0,05$) compared to their control groups. Malnutrition reduced body weight ($p<0,05$), average power and energy expenditure ($p<0,05$) and soleus muscle mass ($p<0,001$). Expression of Atrogin-1 didn't change in any group while the expression of MuRF-1 was increased in DCP group. Cerebral Palsy leads to muscle atrophy and reduction of locomotion. When CP is associated to malnutrition muscle atrophy is followed by increase of muscle protein degradation.

Key Words: Cerebral Palsy. Protein Malnutrition. Anoxia. Motor activity. Rats.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	10
2. INTRODUÇÃO	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Paralisia Cerebral em Humanos	14
3.2 Paralisia Cerebral e nutrição	17
3.3 Plasticidade Fenotípica.....	18
3.4 Modelos experimentais de Paralisia Cerebral	22
4. OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo Geral	25
4.2 Objetivos Específicos.....	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1 Manipulação dos animais.....	26
5.2 Análise do Peso Corporal.....	28
5.3 Formação dos grupos experimentais e desenho do estudo.....	29
5.4 Anóxia Perinatal e Restrição Sensório-motora.....	30
5.5 Registro e análise da Atividade Locomotora.....	33
5.6 Retirada do tecido muscular	37
5.7 Análise da expressão de proteínas Murf-1 e Atrogin-1	38
5.8 Medidas de desfecho e definição das variáveis	39
5.9 Análise estatística.....	40
6. RESULTADOS.....	41
6.1 Efeitos da asfixia na indução da paralisia cerebral em ratos: uma revisão sistemática.....	41
6.2 Efeitos deletérios da associação da desnutrição com a paralisia cerebral em ratos	56
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	81
REFERÊNCIAS	82
ANEXOS	88

1. APRESENTAÇÃO

Esta dissertação faz parte de uma linha de pesquisa do Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio, do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e do Laboratório de Exercício Físico e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória (CAV) - UFPE, que tem como objetivo estudar as repercussões da Paralisia Cerebral experimental associada à desnutrição sobre o músculo esquelético.

De forma original, foram analisadas as modificações no metabolismo proteico muscular após essa lesão cerebral perinatal. As observações no músculo esquelético visam compreender as sequelas do modelo experimental que associa a anóxia perinatal e a restrição sensório-motora.

Os dados obtidos resultaram em um artigo de Revisão Sistemática “Efeitos da asfixia na indução da paralisia cerebral em ratos: uma revisão sistemática”, que será submetido à Revista *Brain & Development*, conceito A2 para a área 21 da CAPES; e um artigo original “Desnutrição altera locomoção e metabolismo proteico na paralisia cerebral experimental”, que será submetido à revista *European Journal of Nutrition*, conceito A1 para a área 21 da CAPES.

Atendendo às normas vigentes do Programa de Pós-graduação em Fisioterapia da UFPE para elaboração da dissertação, o presente exemplar está estruturado da seguinte maneira:

1. Apresentação
2. Introdução
3. Revisão de Literatura
4. Objetivos
5. Materiais e Métodos
6. Resultados – Apresentados como formato de um Artigo de Revisão Sistemática e um Artigo Original
 - 6.1 Artigo de Revisão Sistemática: Efeitos da asfixia na indução da paralisia cerebral em ratos: uma revisão sistemática
 - 6.2 Artigo Original: Efeitos deletérios da associação da desnutrição proteica a modelo de paralisia cerebral em ratos.
7. Considerações Finais e Perspectivas

8. Referências (do corpo da Dissertação)

9. Anexos

2. INTRODUÇÃO

A Paralisia Cerebral (PC) é considerada a causa mais comum de disfunção motora crônica na infância. Esta condição prejudica funções importantes, causando limitação das atividades de vida diária e dependência funcional. Associado a esta condição, um organismo submetido a um ambiente pobre em nutrientes durante o desenvolvimento, o que por si só leva a modificações metabólicas, pode ter ainda mais agravado o seu estado fisiológico. Essa situação não é incomum em populações submetidas a escassos recursos, como em países subdesenvolvidos e em vias de desenvolvimento.

Vários pesquisadores (Strata et al., 2004; Coq et al., 2008; Marcuzzo et al., 2008; 2010; Stigger et al., 2011; 2013) procuram produzir um fenótipo semelhante à Paralisia Cerebral Humana utilizando modelos animais. Dentre os modelos existentes, encontramos a injeção materna de Lipopolissacarídeo (LPS) a fim de causar inflamação, modelos de imobilização/desuso dos membros posteriores, hipóxia-isquemia associada à oclusão arterial, anóxia e Restrição Sensório-motora combinadas ou não e a união desses vários métodos.

O modelo aplicado no presente estudo associa a anóxia perinatal e a restrição sensório-motora, por resultar em um fenótipo motor muito similar ao da PC humana. Além disso, a Paralisia Cerebral associada à desnutrição perinatal é o ponto principal da investigação.

A atrofia é um quadro característico da Paralisia Cerebral, e grande parte dos estudos em modelos animais de PC abordam as sequelas da doença com o objetivo de encontrar soluções terapêuticas e mecanismos de recuperação funcional, sem, contudo, buscarem seus mecanismos patogénéticos.

A atrofia muscular pode acontecer pelo aumento da degradação de proteínas miofibrilares ou pela redução da síntese destas. Dentre as vias que controlam esse processo, a via ubiquitina-proteossoma é importante por ser a principal via de degradação proteica.

Nós postulamos que essa sequela pode estar associada a modificações nesta via de degradação de proteínas miofibrilares e, conseqüentemente, no atraso do desenvolvimento da atividade locomotora.

Assim, os dados provenientes desse estudo podem resultar em contribuições para ajudar na compreensão dessa doença que afeta milhares de crianças no mundo. Esses dados podem proporcionar a compreensão das bases biológicas do desenvolvimento da PC em desnutridos, esclarecendo ou suscitando novos questionamentos a respeito do impacto que a paralisia cerebral pode exercer em animais submetidos à desnutrição perinatal. Assim, estes também podem permitir estratégias de tratamento dessa doença tão comum no dia-a-dia do fisioterapeuta e seus colegas de outras profissões da área da saúde.

O presente estudo teve como objetivo avaliar, em modelo experimental de Paralisia Cerebral em ratos submetidos e não submetidos à desnutrição perinatal, a expressão de proteínas da via de degradação proteica muscular e o desenvolvimento da atividade locomotora.

Nossa hipótese é de que este modelo associado à desnutrição perinatal é capaz de reduzir a atividade locomotora, exacerba a atrofia muscular na PC e leva ao aumento na expressão de proteínas da via de degradação proteica MuRF-1 e Atrogin-1.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Paralisia Cerebral em Humanos

A Paralisia Cerebral (PC) é uma síndrome complexa que compreende um grupo de desordens do movimento e da postura que ocasiona limitação da atividade; A lesão neurológica é estática, permanente e não progressiva consequente à agressão ocorrida durante o desenvolvimento do sistema nervoso do feto ou durante a infância, quando o cérebro ainda é imaturo (BAX et al., 2005; KRIGGER, 2006; CHAN E MILLER, 2014). Os distúrbios são resultantes de lesão de vias motoras corticais, núcleos da base, tálamo, cerebelo, tronco encefálico, substância branca do sistema nervoso central e o córtex cerebral quando estes estão em fase de desenvolvimento (SANGER et al., 2003; COLVER et al., 2014).

Por definição, a patologia responsável pelo desenvolvimento da PC é estática após o período de aquisição da condição, mas os efeitos patológicos no desenvolvimento da criança não são (BLAIR, 2010). Assim sendo, a lesão é estática, porém os sintomas são variáveis e podem mudar com o tempo (BELL et al., 2010).

A prevalência global da PC possui variações pequenas ao longo do tempo, mas se mantém sem alterações consistentes nos últimos 40 anos (BLAIR, 2010; COLVER et al., 2014). Afeta 2 a 3,5 crianças a cada 1.000 nascidos vivos, sendo a causa mais comum de incapacidade motora crônica na infância (COLVER et al., 2014). Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, no entanto, a incidência apresenta-se ainda maior, pois esses países reúnem condições mais favoráveis à ocorrência de problemas crônicos como a PC (HIMMELMANN, 2013), como complicações durante o parto, instalações de saúde precárias e centros de saúde rurais localizados longe da população (IBRAHIM E BHUTTA, 2013).

No Brasil, estima-se que a cada 1.000 crianças nascidas vivas, sete são portadoras de PC, e que cerca de 30.000 a 40.000 novos casos ocorram por ano (MANCINI et al., 2002). A incidência depende do critério diagnóstico de cada estudo, acreditando-se que ela esteja elevada em virtude da deficiência nos cuidados pré e perinatais.

A PC pode ser o resultado de uma ou mais etiologias, sendo difícil determinar a causa na maioria dos indivíduos (JONES et al., 2007). Em humanos, o

desenvolvimento cerebral ainda é intenso durante os primeiros anos de vida. Assim, os danos a este órgão podem ocorrer antes, durante ou até os 5 anos de idade. (CHAN E MILLER, 2014). Dependendo da fase, os fatores de risco são considerados como pré-natais, perinatais (ou neonatais), pós-natais e combinados, além de variarem também de acordo com a idade gestacional (HIMMELMANN et al., 2011).

Fatores de risco neonatais são: gestação abaixo de 32 semanas, baixo peso ao nascer (menor que 2.500g), crescimento intrauterino retardado, gestação múltipla, hemorragia intracraniana, trauma, lesão da substância branca periventricular e leucomalácia periventricular ou hemorragia intraventricular, desnutrição e infecções (KRIGGER, 2006; JOHNSTON E HOON JR, 2006; WANG et al., 2006; JONES et al., 2007; HIMMELMANN et al., 2011). Durante o parto, as principais causas são de trombose do seio venoso, hipertensão materna, pré-eclâmpsia, aspiração de mecônio, asfixia e dificuldades respiratórias, além das infecções já mencionadas (KOMAN et al., 2004; JONES et al., 2007; HIMMELMANN et al., 2011) e os fatores pós-natais mais vistos como etiologia em crianças com PC são meningite bacteriana, encefalites virais, hiperbilirrubinemia e até quedas (KRIGGER, 2006).

Em torno de 70 a 80% das causas de PC ocorrem por complicações na fase pré-natal e em recém-nascidos prematuros, alguns por causas ainda desconhecidas (JOHNSTON E HOON JR, 2006; KRIGGER, 2006). Cerca de 6% dos casos são por danos causados durante o parto, como asfixia (KRIGGER, 2006), podendo chegar a 20% dos casos (COLVER et al., 2014).

Nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, a PC é relacionada a problemas gestacionais, más condições materno-infantis de nutrição e atendimento médico e hospitalar muitas vezes inadequado, dada a demanda das condições clínicas apresentadas principalmente por crianças nascidas antes da correta maturação neurológica (REDDIHOUGH E COLLINS, 2003, HIMMELMANN et al., 2011; SERDAROGLU et al., 2006). A prevalência da PC é inversamente proporcional à idade gestacional e ao baixo peso ao nascer, que chega a 90 casos a cada 1000 nascidos vivos abaixo de 1000g (COLVER et al., 2014). A expectativa de vida para crianças com PC com comprometimento leve ou moderado não difere muito das saudáveis, mas nas formas graves até 50% dos indivíduos vão a óbito nas primeiras duas décadas de vida (HUTTON et al., 1994).

A área cerebral que foi afetada reflete diretamente as incapacidades resultantes, sendo algumas áreas cerebrais mais susceptíveis que outras (KOMAN et al., 2004; JONES et al., 2007). O distúrbio varia em relação ao tempo de exposição e momento da lesão, à apresentação clínica e à gravidade das deficiências (COLVER et al., 2014).

A PC pode ser definida de acordo com o local anatômico da lesão (córtex cerebral, trato piramidal, sistema extrapiramidal ou cerebelo, por exemplo), envolvimento topográfico das extremidades (diplegia, hemiplegia, tetraplegia, quadriplegia), sinais e sintomas clínicos (espasticidade, discinesia, ataxia), grau do tônus muscular (isotônico, hipertônico ou hipotônico) e/ou tempo presumido da lesão (pré, peri ou pós-natal) (COLVER et al., 2014).

Os efeitos da PC no sistema musculoesquelético variam com os tipos e a distribuição da deficiência motora (BLAIR, 2010). Os distúrbios motores são geralmente acompanhados de alterações de sensação, cognição, comunicação, percepção e comportamento (COLVER et al., 2014). Assim, o desenvolvimento global é afetado negativamente, prejudicando diretamente a capacidade exploratória, de linguagem, de aprendizado e de independência (JONES et al., 2007).

Os sinais característicos são espasticidade, aumento de reflexos, atrofia e fraqueza muscular, desordens de movimento, ataxia, rigidez e marcha característica em tesoura (KOMAN et al., 2004; KRIGGER, 2006). Há repercussões negativas sobre o processo de crescimento, como no comprimento e/ou na estrutura muscular e dos ossos (NOVACHEK E GAGE, 2007), assim como anormalidades no tamanho das fibras musculares e transição de seus fenótipos de lentas para rápidas, evidências observadas em biópsias de fibras musculares de paciente com PC (ITO et al., 1996; MARBINI et al., 2002). O aumento do tônus muscular inibe o crescimento do músculo, levando a uma falha progressiva no ritmo de crescimento do comprimento entre osso e músculo, provocando contraturas musculares e articulares (BLAIR, 2010). Os quadris das crianças com PC são normais ao nascimento, mas com a perda do controle motor seletivo e estes desequilíbrios do tônus muscular as deformidades vão surgindo, como coxa valga, displasia acetabular, luxação do quadril e anteversão femoral (BLAIR, 2010; CHAN E MILLER, 2014).

A espasticidade, uma forma de hipertonia, é bastante comum em crianças com PC e é frequentemente acompanhada de fraqueza muscular. Assim, supõe-se que esta característica pode ser uma das causas da espasticidade (BLAIR, 2010).

A força muscular é a capacidade de exercer uma contração voluntária máxima, e a fraqueza, algum prejuízo desta habilidade (MOCKFORD E CAULTON, 2010). A fraqueza muscular é um sintoma comum em crianças com PC, interferindo na função e levando a limitações (ELDER et al., 2003). É de origem multifatorial, dependendo assim de variações no tipo de fibra, do recrutamento das unidades motoras, da co-contração de agonistas e antagonistas, do tamanho e da rigidez muscular (GIVON, 2009). A musculatura como um todo pode ser prejudicada, mas alguns músculos são afetados mais que outros. Geralmente os músculos que demonstram maior envolvimento são os flexores plantares e dorsiflexores (ELDER et al., 2003).

A força muscular está altamente correlacionada proporcionalmente com a área de secção transversa fisiológica do músculo (MOCKFORD E CAULTON, 2010), sendo assim, músculos maiores teriam mais força (GIVON, 2009). A força por unidade de área de secção transversa aumenta com o crescimento sendo provavelmente alcançada no adulto logo após a puberdade (MOCKFORD E CAULTON, 2010).

As patologias musculoesqueléticas desenvolvidas ao longo do tempo podem ter efeitos devastadores sobre a qualidade de vida dos pacientes. Não apenas em relação às limitações, mas também porque a pessoa está destinada a nunca alcançar totalmente as habilidades motoras funcionais (BLAIR, 2010).

3.2 Paralisia Cerebral e nutrição

Mais de 80% dos nascimentos do mundo ocorrem em países com poucos recursos e em torno de 200 milhões de crianças abaixo de 5 anos podem estar em risco de desenvolverem deficiências devido à pobreza, saúde precária e desnutrição (IBRAHIM E BHUTTA, 2013).

A alimentação é uma das atividades mais importantes para manutenção da saúde e bem-estar de todos os indivíduos, e isto tem particular importância em crianças com Paralisia Cerebral (FUNG et al., 2002). Mas o crescimento e o estado nutricional inadequados são comumente encontrados em aproximadamente um terço das crianças com PC, por serem considerados efeitos secundários normais em

pacientes com esta patologia (BELL et al., 2010; KARAGIOZOGLOU-LAMPOUD et al., 2012).

As disfunções alimentares em crianças com PC são geralmente devido à interação de vários fatores, como disfunção do controle motor oral, maturação neurológica anormal e má postura ao sentar durante a alimentação devido à instabilidade do tronco (FUNG et al., 2002). Fatores nutricionais como ingestão alimentar inadequada, secundária à capacidade motora oral e de deglutição prejudicadas e pobre estado nutricional podem ter impacto direto no crescimento dos indivíduos com PC (BELL et al., 2010).

A dificuldade de deglutição é encontrada em 99% das crianças com PC severa, e a maioria destes apresentam moderada, severa ou profunda disfagia (BELL et al., 2010). As dificuldades na deglutição, associadas a contraturas na ATM e vômitos, presentes em pacientes com PC, podem tornar a alimentação demorada e desagradável tanto para o paciente quanto para o cuidador, sendo isso responsável, em alguns casos, pelo mal estado nutricional de pacientes com PC (KRIGGER, 2006; BLAIR, 2010).

Tanto a paralisia cerebral quanto alterações nutricionais podem ocasionar sequelas duradouras ao aparelho locomotor. Foi observado que a desnutrição durante o período pré e pós-gestacional causa vários danos à estrutura muscular como redução do peso muscular (BEDI et al., 1982; BARROS et al., 2004), alterações nas proporções relativas dos tipos de fibras musculares (TOSCANO et al., 2008) e a redução no diâmetro e na área de secção transversa da fibra (BEDI et al., 1982; BOREHAM et al., 1988; OLIVEIRA et al., 1999; MALLINSON et al., 2007). A desnutrição durante a lactação também podem ocasionar perda de massa muscular (FIOROTTO et al., 2000), promover modificações estruturais nos sarcômeros (OUMI et al., 2000) além de aumentar o tempo de maturação das fibras musculares (SILVADO E WERNECK, 2006). Dessa forma alterações nutricionais associadas à paralisia cerebral podem comprometer a reabilitação ou mesmo agravar o quadro clínico de indivíduos acometidos por essa patologia.

3.3 Plasticidade Fenotípica

Um dos fenômenos biológicos que pode dar fundamentos à relação entre agressões sofridas durante o desenvolvimento e as repercussões tardias sobre os sistemas fisiológicos é a plasticidade fenotípica. Trata-se da capacidade que o organismo tem de expressar diferentes fenótipos de acordo com o ambiente a qual é exposto, sendo a nutrição um dos principais indutores de plasticidade fenotípica (GLUCKMAN et al., 2005). Esta perspectiva de estudo, que tem fundamento teórico na biologia evolucionista, considera que o ambiente intra-uterino e pós-natal estão relacionados à plasticidade do organismo.

No trabalho de Gallagher e cols. (2005), foi demonstrada uma associação entre a restrição proteica gestacional e a redução da atividade máxima da citocromo c oxidase cerebral no feto (uma enzima mitocondrial que é parte da cadeia transportadora de elétrons e fonte celular de ATP), reduzindo assim a fosforilação oxidativa no cérebro, inclusive, no período pós-natal. Segundo o autor, esta observação pode ser uma parte das respostas adaptativas do desenvolvimento para reduzir o consumo de energia e promover a sobrevivência ou o desenvolvimento perinatal num ambiente predestinado a ser nutricionalmente deficiente (Gallagher et al., 2005).

A Paralisia Cerebral oferece um modelo para estudar a plasticidade do cérebro em desenvolvimento, pois seus mecanismos compensatórios após uma lesão são considerados superiores aos do cérebro já maduro (KRÄGELOH-MANN E CANS, 2009).

O músculo esquelético é um tecido bastante dinâmico, capaz de se adaptar ao longo da vida em respostas a vários estímulos, como ativação neural, cargas mecânicas, fatores de crescimento e estado nutricional, por exemplo (BODINE E BAEHR, 2014).

Entender as causas da fraqueza muscular na PC é importante para descrever programas de reabilitação apropriados (ELDER et al., 2003). Os mecanismos que levam à fraqueza muscular parecem estar relacionados às alterações epigenéticas na expressão de proteínas em tecidos-chave do metabolismo, como o músculo esquelético.

A manutenção da massa muscular se dá pelo equilíbrio entre as taxas de síntese e degradação proteica, que pode ser afetado, por exemplo, por fatores mecânicos impostos, nutrição, hormônios e inclusive pela altitude (MCCARTHY E ESSER, 2010; CHAUDHARY et al., 2012; GUMUCIO E MENDIAS, 2012), sendo

importante pra determinar a eficiência do crescimento e catabolismo celular (SALEM et al., 2006). Uma redução da massa muscular pode se dar pelo aumento da expressão da via de degradação ou pela redução da síntese de proteínas (GUMUCIO E MENDIAS, 2012). A degradação de proteínas musculares é um processo altamente seletivo, regulado e dependente de energia, controlado pelas atividades de enzimas proteolíticas, envolvendo muitas vias de sinalização (HERSHKO et al., 2000, GUMUCIO E MENDIAS, 2012).

Dentre as vias de proteólise muscular, são bem conhecidas a autofagia, proteases ativadas por cálcio (calpaínas e caspases), e o sistema ubiquitina-proteossoma (TEIXEIRA et al., 2012). Este último é bem estabelecido como o principal processo envolvido na degradação, principalmente sob condições de restrição proteica ou energética (CARBONE et al., 2012), sendo uma via, ATP dependente. É um sistema responsável por processar e degradar proteínas celulares essenciais para vários processos básicos (TEIXEIRA et al., 2012). Esta via está envolvida com a marcação da proteína a ser degradada por ligações covalentes de várias moléculas de ubiquitina (JAGOE E GOLDBERG, 2001). O processo de degradação da proteína ubiquitinada ocorre no proteossoma 26S, um complexo de uma ou três grandes enzimas que degradam proteínas ubiquitinadas em pequenos peptídeos (BAUMEISTER et al., 1998; JAGOE E GOLDBERG, 2001; TEIXEIRA et al., 2012).

Existem três componentes enzimáticos necessários para ligar cadeias de ubiquitina em proteínas destinadas para a degradação: E1 (enzimas ativadoras de ubiquitina), que utiliza o ATP para criar uma forma altamente reativa da ubiquitina, transferindo-a em seguida para a E2 (enzima transportadora de ubiquitina), que prepara a conjugação da ubiquitina, e para que seja feita a transferência ao substrato ativado, requer a utilização da última, a enzima chave do processo, E3 (proteína ubiquitina ligase), que acopla a ubiquitina ativada na proteína alvo, conferindo especificidade a esta (JACKSON et al., 2000; JAGOE E GOLDBERG, 2001; TEIXEIRA et al., 2012). Foram identificadas duas E3 ligases no músculo esquelético relacionadas com a atrofia muscular, Atrogin -1 (Muscle Atrophy F-box, MAF-bx) e MuRF-1 (Muscle Ring Finger-1), encontradas em modelos experimentais que provocaram a desnervação, imobilização e suspensão do membro (BAJOTTO et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2012; DELFINO et al., 2013) (Figura 1).

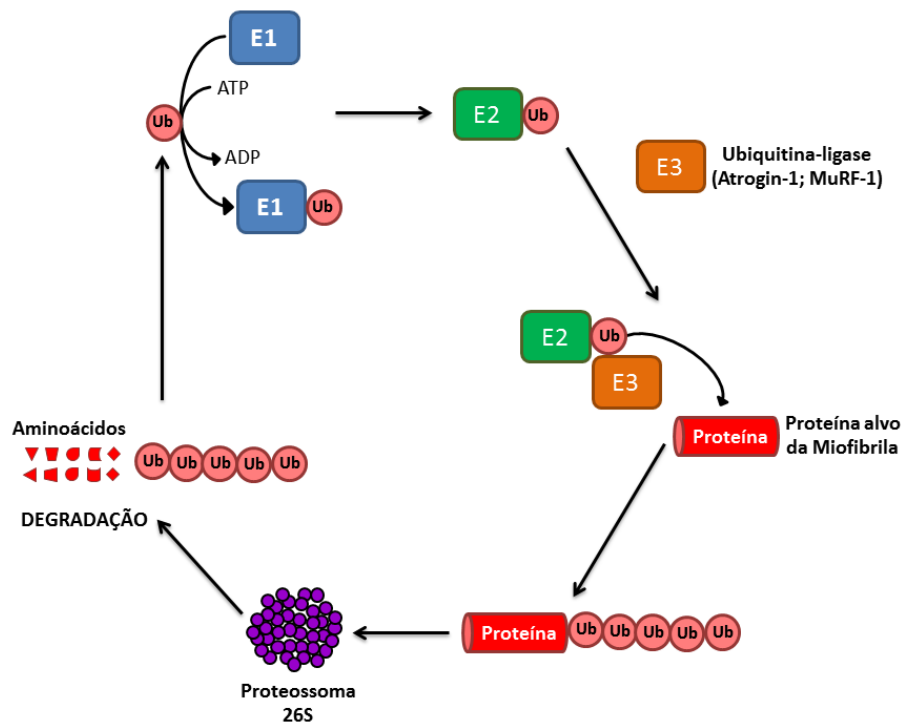


Figura 1: Esquema da degradação proteica pela via ubiquitina-proteossoma. E1-Enzima 1, Ativadora de Ubiquitina; E2=Enzima 2, Transportadora de Ubiquitina; E3=Enzima 3, Ubiquitina Ligase; Ub=Ubiquitina; ATP=Adenosina Tri-Fosfato; ADP=Adenosina Di-Fosfato. Fonte: Autor.

Mas como este sistema não é capaz de degradar proteínas miofibrilares inteiras, as mudanças na sua atividade são precedidas por alterações em outros sistemas proteolíticos (BATISTELA et al., 2014).

Já foi estudado que o sistema Ubiquitina-proteossoma pode ser controlado por duas potentes citocinas indutoras de atrofia muscular, a miostatina e o TGF β (Fator de crescimento tumoral beta) (JAGOE E GOLDBERG, 2001). Ambos estão mantidos em forma inativa na matriz extracelular do músculo, e quando são ativadas, ligam seus receptores e ativam a cascata de transdução de sinal de Smad3 e p38 MAPK. Ativação de p38 MAPK induz ativação de Atrogin-1 e expressão de MuRF-1, embora os fatores de transcrição específicos que regulam essas E3 ligases não sejam tão conhecidos (GUMUCIO E MENDIAS, 2012). A Smad-3 está diretamente relacionada ao aumento da expressão de Atrogin-1, mas através de ligações com a FOXO3 (Forkhead Box O3), pode induzir também o aumento da expressão de MuRF-1 (BOLLINGER et al., 2014). A FOXO3 é um importante regulador tanto de Atrogin-1 quanto de MuRF-1, e a perda da sua

sinalização inibe a habilidade das fibras musculares de expressarem essas proteínas (GUMUCIO E MENDIAS, 2012).

Além dessas, o aumento de NF-Kb também parece aumentar a degradação muscular ativando ambas as proteínas, estando relacionado com a atrofia por desuso (BODINE E BAHER, 2014). Caspase-3, através da clivagem de proteínas específicas das miofibrilas, liberam fragmentos de actina que podem ser usados para degradação pela via ubiquitina-proteossoma e assim há aumento de expressão das E3 ligases Atrogin-1 e MuRF-1 (ZEMAN et al., 2009).

Não se sabe, no entanto, de que forma ocorre a regulação da via ubiquitina-proteossoma na PC, estando essa associada ou não à desnutrição perinatal.

3.4 Modelos experimentais de Paralisia Cerebral

Existem alguns modelos animais que tentam reproduzir os danos causados pela PC e isso permite, dentro dos devidos limites, a extrapolação para humanos. A utilização do rato como animal experimental, obedecendo aos critérios éticos, permite a observação do desenvolvimento de comportamentos e suas sequelas, em particular a marcha e seus transtornos, os quais poderão ser evidenciados na PC induzida (STRATA et al., 2004).

Estudos que utilizaram injeções maternas de Lipopolissacarídeo (LPS) na fase pré-natal provocam respostas inflamatórias levando a lesões cerebrais (WANG et al., 2006) e sequelas no desenvolvimento sensório-motor, mas que não são contínuas na fase adulta do animal ou sequer obtiveram correlações das lesões cerebrais provocadas com os déficits motores da PC (BELL E HALLENBECK, 2002; TOSO et al., 2005). Outros autores verificaram que o uso do LPS levou a dano na substancia branca encefálica, mas os animais não sofreram atraso nos marcos de desenvolvimento motor (TOSO et al., 2005; ROBERSON et al., 2006).

A anóxia e a hipóxia-isquemia perinatal também podem produzir alterações que se assemelham à PC humana. Ambas são utilizadas em roedores por provocar lesões como atrofia do hipocampo, córtex motor, mas as alterações motoras observadas são sutis e transitórias com o passar do tempo (LUBICS et al., 2005; ROBINSON et al., 2005; ITO, 2010; TAKADA et al., 2011).

Como a imobilização de partes do corpo acarreta baixa funcionalidade e/ou atrofia induzida pelo desuso, prejudicando o controle motor e as atividades por ele

desenvolvidas (BRITO et al., 2011), modelos de desuso dos membros posteriores têm sido usados a fim de se obter efeitos mais duradouros no sistema muscular e assim estudar as adaptações do músculo esquelético ao desuso crônico e os efeitos deste neste sistema. O músculo esquelético é bastante plástico e seu fenótipo varia de acordo com o estímulo que lhe é fornecido (BRITO et al., 2011). Estudos observaram que após o período de imobilização, os músculos apresentaram redução das proteínas de síntese e aumento das proteínas de degradação muscular, redução do conteúdo de glicogênio, redução da área de secção transversa, alteração do fenótipo das fibras rápidas para fibras lentas, atrofia muscular com redução do peso, comprimento e número de sarcômeros em série do músculo (COUTINHO et al., 2002; BRITO et al., 2011; STIGGER et al., 2011).

Para se entender os aspectos da patogênese da PC tanto a nível central quanto periférico, a associação destes insultos tem mostrado ser um modelo experimental de interesse. O modelo foi inicialmente proposto por Strata e cols. (2004) e Coq e cols. (2008), que utilizaram a anóxia perinatal associada à restrição sensório-motora, verificando que os animais submetidos à restrição, associada ou não à anóxia perinatal, apresentaram efeitos duradouros como a taxa de crescimento corporal reduzida, aumento do tônus muscular, marcha de padrão anormal, atrofia muscular, sendo estas alterações semelhantes às observadas em pacientes com PC. Além disso, animais que foram apenas submetidos à anóxia perinatal sofreram alterações na representação do córtex motor, mas os grupos restritos sofreram distorções maiores (STRATA et al., 2004).

Estudos de Marcuzzo et al. (2008; 2010) e Stigger et al. (2011), que utilizaram o mesmo modelo proposto por Coq e Strata, encontraram resultados semelhantes: alterações motoras mensuráveis, como alteração de aquisição de marcos do desenvolvimento, redução do tamanho da passada, aumento do ângulo do pé e prejuízo em habilidades motoras; alterações musculares como redução da área muscular e aumento da densidade de fibras; e modificações encefálicas como a redução de neurônios do córtex somatossensorial. Apenas a anóxia não levou a déficits motores aparentes, mas levou ao aumento do número de células gliais. O número de neurônios foi reduzido apenas com a restrição sensório-motora, assim como a tendência de redução do corpo caloso. A associação de anóxia e restrição sensório-motora provocou redução na espessura do córtex cerebelar e um déficit motor mais complexo comparando apenas com a restrição, caracterizando melhor o

modelo experimental de PC. Uma vez que este modelo se aproxima do fenótipo da PC em humanos, com sinais e sintomas similares (MARCUIZZO et al., 2008; 2010; STIGGER et al., 2011), será o modelo integralmente seguido no presente estudo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar em modelo experimental de PC (restrição sensório-motora associada à anóxia perinatal) em ratos, submetidos ou não à desnutrição perinatal, a expressão de proteínas da via de degradação proteica muscular e o desenvolvimento da atividade locomotora.

4.2 Objetivos Específicos

Avaliar, em modelo experimental de PC sobre ratos submetidos ou não à desnutrição:

- A atividade locomotora dos animais aos 8, 14, 17, 21 e 28 dias de vida pós-natal;
- O peso corporal dos animais ao nascer e aos 8, 14, 17, 21, 28 e 29 dias de vida pós-natal
- O peso corporal do músculo sóleo aos 29 dias de vida pós-natal;
- A expressão e ativação das proteínas da via de degradação proteica MuRF-1 e Atrogin-1 no músculo sóleo aos 29 dias de vida pós-natal.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi de caráter experimental com ratos, realizado no laboratório de Fisiologia da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da UFPE – Recife e no laboratório de Educação Física e Plasticidade Fenotípica do CAV (Centro Acadêmico de Vitória) UFPE – Vitória de Santo Antão.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE, sob protocolo número: 23076.014726/2013-74 (Anexo A) e seguiu as normas sugeridas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a lei 11.794 de 8 de Outubro de 2008, e com as normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*.

5.1 Manipulação dos animais

Foram utilizados 75 ratos machos provindos de 21 fêmeas nulíparas e machos reprodutores, da raça *Rattus Norvegicus Albinus*, da linhagem *Wistar*. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura ambiente de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em ciclo normal (luzes acesas das 06:00 às 18:00), alojados em gaiolas de polipropileno com dimensões 46x31x21 cm (CxLxA), com livre acesso à água e alimentação em todas as etapas do experimento (Figura 2).



Figura 2: Acondicionamento dos animais no Biotério, sob condições padrões e com livre acesso à água e alimentação.

Os genitores estavam com idade (90-120 dias) e peso (220-250g) adequados para reprodução, provenientes do Biotério de Criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Foram acasalados (duas fêmeas para um macho) e o dia em que se detectou a presença de espermatozoides através de lâmina histológica contendo esfregaço vaginal foi designado como o dia da concepção. A partir deste dia, considerado o dia 0 de gestação, as ratas foram alojadas em gaiolas individuais e separadas aleatoriamente em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: Grupo Normonutrido (N, n= 9, 17% proteína) e Desnutrido (D, n= 12, 8% proteína – Hipoproteico) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição da dieta experimental para roedores, com diferentes teores de proteína.

Ingredientes	Quantidade*	
	8 %	17%
Caseína	94,12 g	200,00 g
Mix Vitamínico**	10,00 g	10,00 g
Mix Mineral***	35,00 g	35,00 g
Celulose	50,00 g	50,00 g
Bitartarato de Colina	2,50 g	2,50 g
DL-Metionina	3,00 g	3,00 g
Óleo de Soja	70,0 ml	70,0 ml
Amido de Milho	503,40g	503,40 g
Amido Dextrinizado	132,00 g	132,00 g
Sacarose	100,00 g	100,00 g
THBT (antioxidante de gordura)	0,014 g	0,014 g

*Quantidade para 1 kg de dieta. Fonte: REEVES et al., 1993.

** Conteúdo da mistura mineral (mg/kg de dieta): CaHPO₄, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO₄, 2000; Fe₂O₃, 120; FeSO₄·7H₂O, 200; elementos traços, 400 (MnSO₄·H₂O, 98; CuSO₄·5H₂O, 20; ZnSO₄·7H₂O, 80; CoSO₄·7H₂O, 0.16; KI, 0.32; amido suficiente par 40 g [per kg of diet]).

***Conteúdo da mistura de Vitaminas (mg/kg de dieta): retinol, 12; colecalciferol, 0.125; tiamina, 40; riboflavina, 30; ácido pantotênico, 140; piridoxina, 20; inositol, 300; cianocobalamina, 0.1; menadiona, 80; ácido nicotínico, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; p-ácido aminobenzóico, 100; biotina, 0.6.

Logo após o nascimento os neonatos foram selecionados aleatoriamente em ninhadas de oito filhotes por mãe quando a descendência excedeu essa quantidade, dando preferência aos filhotes machos. Os filhotes fêmeas compuseram a ninhada

apenas quando a quantidade de machos não foi suficiente (ajustando a ninhada para 8 filhotes), não sendo utilizadas nos experimentos e obtenção de resultados.

Durante o período de lactação as mães continuaram a se alimentar com sua respectiva dieta administrada durante o período de gestação, e os grupos experimentais obtidos pelos filhotes seguiram de acordo com a manipulação nutricional de sua respectiva mãe.

Os animais foram amamentados durante os primeiros 21 dias de vida. A partir do dia 22 até o dia 29, foram mantidos em gaiolas com 2 a 4 animais advindos da mesma ninhada e do mesmo grupo experimental, alimentados com a respectiva dieta desde a gestação. Aos 29 dias de vida pós-natal foi realizada a eutanásia através de decapitação e posterior retirada de materiais histológicos para análise biomolecular.

5.2 Análise do Peso Corporal

O peso corporal das gestantes foi verificado a cada três dias durante toda a gestação e também durante o período de lactação (Figura 3), utilizando uma balança eletrônica digital (Marte, modelo S-1000, capacidade de 1 kg e sensibilidade de 0,1g), para acompanhamento da evolução de peso nos períodos de gestação e lactação.

O peso corporal dos filhotes foi verificado ao nascer, no 8º, 14º, 17º, 21º, 28º e 29º dia de vida pós-natal, para acompanhamento da taxa de crescimento desses animais e para obtenção dos dados da análise da atividade locomotora e normalização da massa do músculo sóleo.



Figura 3: Ilustração da pesagem do animal. Fonte: Arquivo de Luana Moitta.

5.3 Formação dos grupos experimentais e desenho do estudo

Os filhotes das mães normonutridas (mães $n=9$; filhotes $n=37$) foram subdivididos em outros dois grupos: Normonutrido - Controle (NC, $n=16$) e Normonutrido-PC (Anóxia Perinatal + Restrição Sensório-motora) (NPC, $n=21$). Da mesma forma, os filhotes do grupo de mães desnutridas (mães $n=12$; filhotes $n=38$) foi subdividido em mais dois grupos: Desnutrido - Controle (D, $n=20$) e Desnutrido-PC (Anóxia Perinatal + Restrição Sensório-motora) (DPC, $n=18$) (Figura 4).

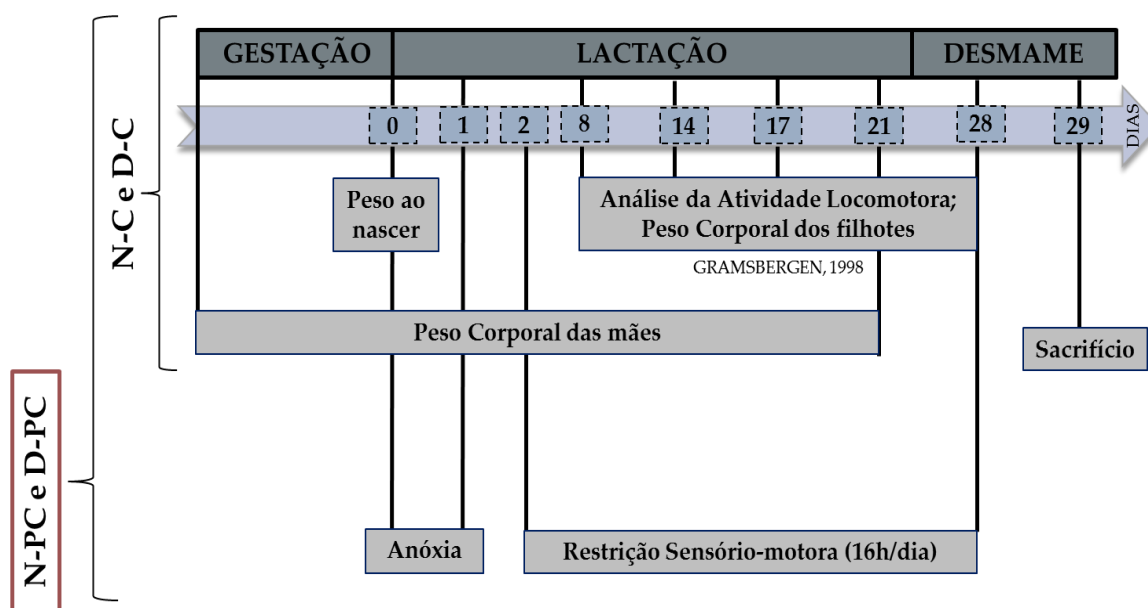


Figura 4: Desenho experimental representando os procedimentos realizados nos grupos Normonutrido e Desnutrido Controle (N-C e D-C) e Normonutrido e Desnutrido PC (N-PC e D-PC).

5.4 Anóxia Perinatal e Restrição Sensório-motora

O modelo experimental de paralisia cerebral baseou-se nos experimentos de Strata et al. (2004), Coq et al. (2008) e Marcuzzo et al. (2008, 2010). Este modelo associa a anóxia perinatal a um modelo de restrição sensório-motora dos membros inferiores semelhante à falta de movimentação ativa/espontânea ocorrida na PC.

Os animais selecionados aos grupos Normonutrido – PC (n=21) e Desnutrido – PC (n=18) foram submetidos à anóxia perinatal no dia do nascimento (P0) e no dia seguinte (primeiro dia de vida pós-natal – P1). Para tal, utilizamos uma câmara de anóxia hermeticamente fechada com tampa (Bonther; Figuras 5 e 6B), com dimensões 16x16x12 cm (CxLxA), parcialmente imersa em um banho-maria (Biomatic; Figura 5C), de dimensões 35x20x11,5 cm (CxLxA) mantido em 37°C. A câmara estava acoplada a um cilindro de gás nitrogênio (N₂ 100%) (Linde; Figura 6A) 9L/min, por um período 12 minutos em cada dia. Após os 12 minutos de anóxia, os animais foram postos em temperatura e ar ambiente, e após recuperação de sua coloração rosada e respiração normal, foram recolocados em suas respectivas gaiolas com suas mães.



Figura 5: Câmara utilizada para anóxia perinatal.

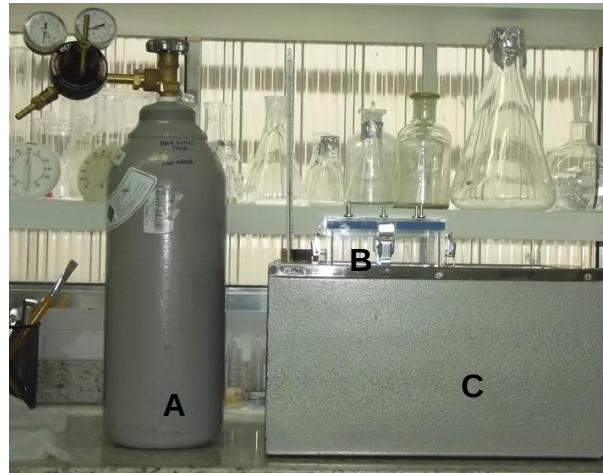


Figura 6: Materiais utilizados no procedimento de anóxia perinatal. A. Cilindro de Nitrogênio; B. Câmara de anóxia; C. Banho-maria.

A restrição sensório-motora foi realizada do segundo dia de vida pós-natal ao vigésimo-oitavo (P2 ao P28), durante 16 horas por dia (das 20h às 12h do dia seguinte), estando o animal livre para movimentação nas 8 horas restantes (das 12h às 20h).

Para a restrição, utilizamos uma órtese moldada com massa de epóxi, presa ao quadril do animal, estando o mesmo com as patas posteriores estendidas. Para fixar o quadril e membros posteriores do animal à órtese de epóxi foram utilizadas fitas micropore e esparadrapo, de modo a causar o mínimo de ferimentos possível e não prejudicar a eliminação de urina e fezes do animal bem como os cuidados maternos (Figura 7).



Figura 7: Restrição sensório-motora. A: Modelo de epóxi utilizado nas 16 horas de restrição por dia; B: Filhote com a órtese presa ao quadril mantendo suas patas posteriores estendidas e assegurando a eliminação de urina e fezes; C: Cuidados maternos não prejudicados para ambos os subgrupos.

Apesar de a fita micropore ser usada para evitar ferimentos nos animais no momento da restrição, as lesões tornaram-se inevitáveis. Por conta disso, alguns cuidados adicionais foram tomados: 1) Foi utilizada tesoura pequena para cortar as fitas das patas posteriores e um cotonete embebido em óleo mineral inodoro, e assim facilitar a retirada quando as fitas estavam muito coladas às patas e ao dorso dos animais. Quando utilizado o óleo mineral, seu excesso foi recolhido após a retirada das fitas utilizando algodão molhado com álcool 70°; 2) Após a retirada das fitas, um cotonete embebido em merthiolate foi utilizado nos locais em que as mesmas se encontravam, visto que sua ação é antisséptica, limpa os ferimentos e combate possíveis bactérias, evitando as infecções; 3) Nos animais mais velhos, as fezes eliminadas não raramente acabavam por sujar as patas dos animais, sendo necessário o uso de algodão encharcado em água para limpeza dos animais antes do uso do merthiolate (Figura 8).



Figura 8: Alguns dos materiais utilizados durante e após a retirada das órteses. (A) Algodão; (B) Óleo Mineral; (C) Merthiolate; (D) Cotonetes.

A partir dos sete dias que antecediam o desmame, foram necessárias adaptações nas gaiolas dos animais para evitar desidratação e desnutrição por falta/dificuldade de acesso dos animais à água e comida, respectivamente. Assim, bebedouros para aves e comedouros para roedores foram acondicionados dentro das gaiolas, promovendo acesso dos animais à água e à ração (Figura 9). Nos grupos controles foi adotado o mesmo procedimento.

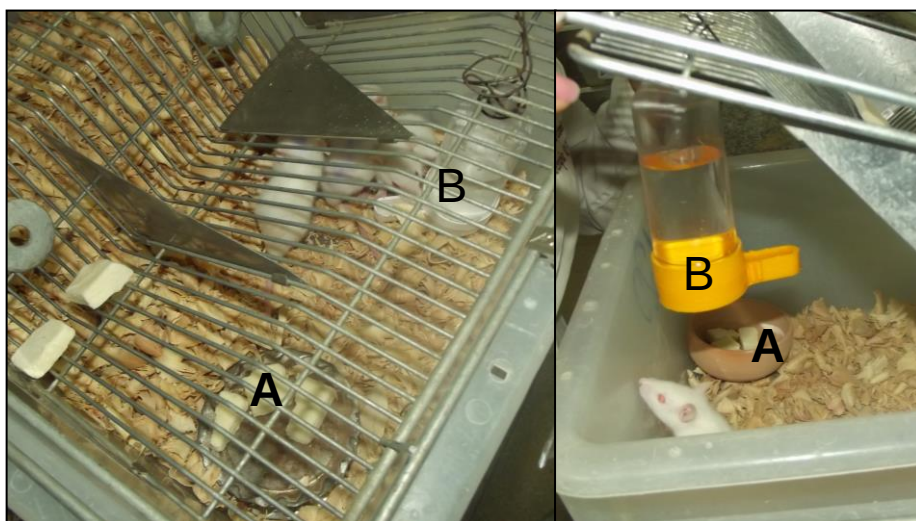


Figura 9: Adaptações para facilitar o acesso dos animais à água e ração nas gaiolas: (A) Comedouro de roedor; (B) Bebedouro de aves.

5.5 Registro e análise da Atividade Locomotora

O estudo da atividade locomotora foi realizado entre 18:00h e 20:00h, por ser no ciclo escuro do animal, onde o mesmo se encontra naturalmente em estado de vigília. As filmagens ocorreram numa sala sem iluminação anexa ao Biotério. A avaliação dos filhotes aconteceu no 8º, 14º, 17º, 21º e 28º dia de vida pós-natal (ARAGÃO, 2006; ARAGÃO *et al.*, 2011).

Utilizamos um sistema de monitoramento em campo aberto circular ($\varnothing 1\text{m}$), delimitado por paredes de 30 cm de altura, com superfícies internas de cor preta e em sua base uma superfície de EVA (etil vinil acetato) também preta, de forma que seja obtido um maior contraste entre o animal e o campo. Uma câmera digital (VTR® 6638 – CCTV System), com sensor de infravermelho e LED de iluminação, conectada a um computador, esteve fixada ao teto a uma distância de 2.65m do solo e posicionada de forma vertical no centro do campo a fim de filmar o animal enquanto o mesmo se movimentava (Figura 10A). A câmera apresenta resolução de 420 linhas, velocidade entre 1/60 e 1/100s e sua sensibilidade permite registrar imagens com iluminação mínima, até 0,1lux (Figura 10B) (ARAGÃO, 2006; ARAGÃO *et al.*, 2011). Para as filmagens foi utilizado o software Ulead VídeoStudio® (Figura 11).

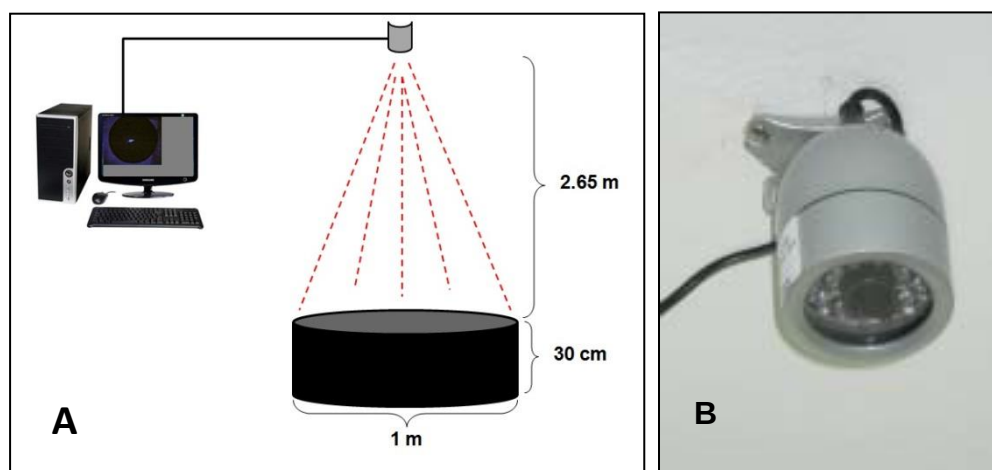


Figura 10: A – Representação esquemática do Campo Aberto e do sistema de monitoramento com suas respectivas distâncias; B – Câmera digital utilizada no registro das filmagens. Adaptado de Aragão (2006).

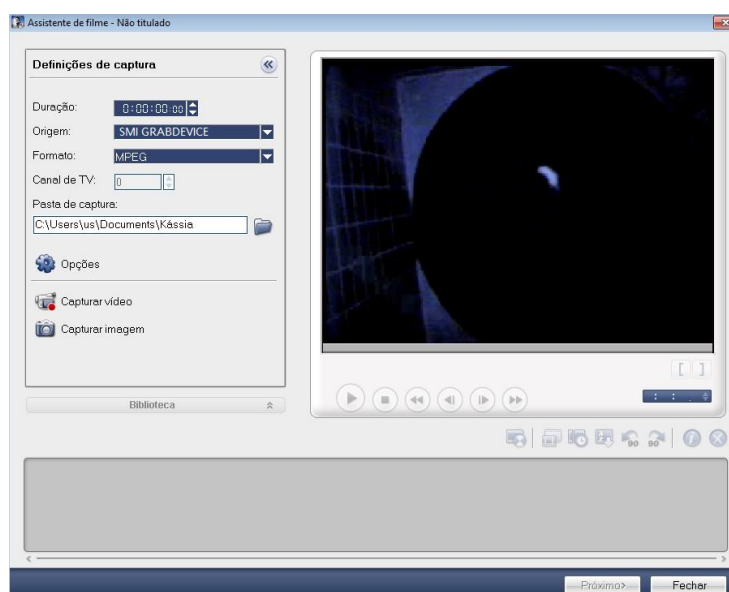


Figura 11: Ilustração do Software Ulead VideoStudio, utilizado para a filmagem da Atividade Locomotora dos animais.

Os animais foram posicionados no centro do campo aberto e a livre movimentação foi registrada por um período de 5 minutos cada um (CITÓ, 2012). Entre as avaliações dos animais, o campo foi limpo com solução de hipoclorito e

água e o EVA trocado, para que possíveis odores não interferissem no comportamento do outro animal a ser avaliado.

Após o registro, o filme foi convertido em quadros (454 quadros para cada filmagem de 5 minutos, com intervalo de tempo de aproximadamente 0,668 seg. entre os quadros) utilizando o software CapturaSeqAVI[®]. Com o software Paint[®] uma máscara foi confeccionada para que a imagem do animal no campo estivesse isolada, apagando todos os objetos que estivessem fora deste (Figura 12).

Através do software MATLAB[®] versão 7.0 foram realizadas as análises das imagens captadas, de onde posteriormente se extraíram algumas grandezas físicas para obtermos informações acerca do comportamento do animal.

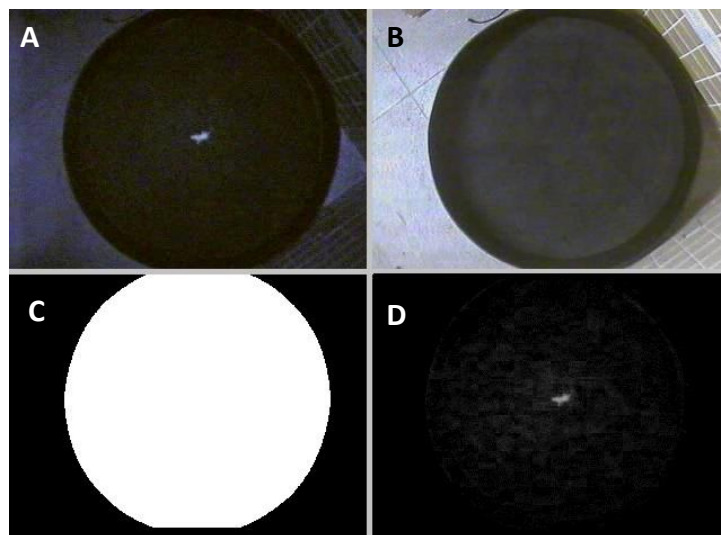


Figura 12: A – Imagem da vista superior do campo, com o animal no centro em ambiente escuro. B – Imagem do campo aberto em ambiente claro. C – Máscara usada para isolar a imagem do campo com o animal. D – Imagem final (figura C sobre a figura A) produzida e utilizada no programa Matlab[®] para calcular os parâmetros avaliados.

Os parâmetros avaliados foram:

1. Distância Real Percorrida (m): Deslocamentos (em metros, m) realizados pelo animal.
2. Velocidade Média: Relação do deslocamento pelo tempo em que o animal movimentou. Fórmula: $VM = \Delta S / \Delta T$, Onde VM = Velocidade Média (metros por

segundo, m/s), ΔS = deslocamento total (m) e ΔT = tempo total de análise – tempo de parada (s);

3. Gasto de Energia: Gasto de energia do animal pelo movimento realizado.
Fórmula: $E = (mV^2)/2$, onde E = Energia (Joules, J), m = massa do animal (gramas, g) e V = Velocidade do animal (m/s);
4. Potência Média: potência produzida durante o período de deslocamento.
Fórmula: $PM = mV^2/2\Delta T$, Onde PM = Potência Média (miliwatts, mw), m = massa do animal (g), V = velocidade média (m/s) e ΔT = tempo total de análise – tempo de parada (s);
5. Número de paradas: Número total de paradas realizadas pelo animal dentro do campo no período de avaliação;
6. Período de tempo que o animal permanecer parado durante o registro (s);
7. Relação de tempo total parado/Número de Paradas (s);
8. Tempo nas áreas 1, 2 e 3 (s): O campo foi subdividido em 3 áreas circulares, sendo a área 1 a central, a área 2 a intermediária e a área 3 a periférica (Figura 13), cada área com o mesmo valor de raio (raio total do campo, R , de 50 cm, dividido em 3 partes, r). Para cada área foi realizado um cálculo diferente, sendo:
 - a) Fórmula $A1 = \pi \cdot r^2$, onde π = letra grega “pi”, com valor de 3,14; r = raio da circunferência, de 16,67cm.
 - b) Fórmula $A2 = \pi (R1^2 - r^2)$, onde $R1$ = Raio do segundo círculo, que equivale a $2r$.
 - c) Fórmula $A3 = \pi (R^2 - R1^2)$, onde R = Raio do campo.

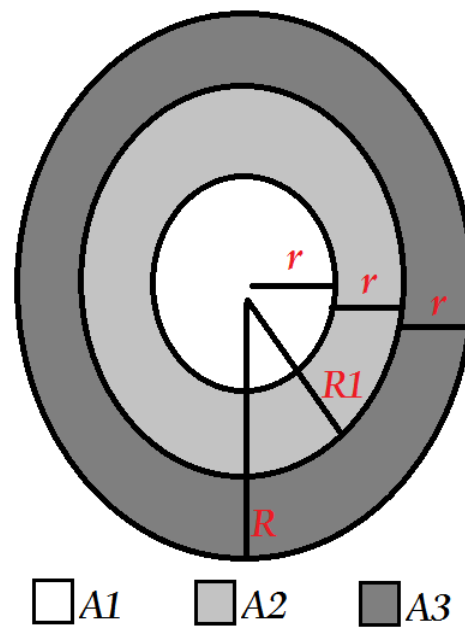


Figura 13: Esquema das áreas do campo aberto. R = raio do campo e da (0,5m); R1 = raio do segundo círculo; r = raio do círculo menor e de cada área. A1 = Área 1; A2 = Área 2; A3 = Área 3.

Após o registro a Atividade Locomotora os animais foram pesados em uma balança eletrônica digital com capacidade máxima de 1000 g e menor divisão de 0,01g.

5.6 Retirada do tecido muscular

No 29º dia pós-natal, os animais foram decapitados, suas patas posteriores dissecadas e os músculos sóleos imediatamente pesados e congelados após a retirada. A massa (ou o peso) de cada músculo (MM, em gramas) foi mensurada e normalizada utilizando a massa (ou peso) corporal (MC, em gramas) para obter a relação MM/MC. O músculo sóleo da pata direita foi congelado com dióxido de carbono solidificado a -78,5°C e armazenados a -80 °C, usados para avaliação da expressão de proteínas de degradação protéica.

5.7 Análise da expressão de proteínas Murf-1 e Atrogin-1

O músculo sóleo da pata direita foi homogeneizado em tampão de extração (pH 7,5; 10mM de EDTA, Trisma base 100mM, Pirofosfato de Na 10mM, Fluoreto de Na 100mM, PMSF 2mM, Ortovanadato de Na, Aprotinina 0,1mg/ml – os dois últimos reagentes sempre foram adicionados no momento da homogeneização). Triton 10% foi acrescentado ao homogenato e sem seguida foi decantado no gelo por 40 minutos. Após esse período, foi centrifugado a 11000RPM (Rotações Por Minuto) durante 30min, em temperatura de 4°C. Após centrifugação, todo o sobrenadante foi separado e utilizamos apenas 2uL para a dosagem do conteúdo total de proteínas utilizando o método proposto por Bradford (1976) com o kit DC Protein Assay Bio-Rad. A solução de Bradford foi preparada usando Azul de Coomassie G250 (0,01%), etanol (4,75%) e ácido fosfórico (8,5%). O corante se liga à cadeia proteica, gerando um complexo de cor azul. A reação é colorimétrica e a absorbância foi determinada a 595 nm. Os resultados de absorbância foram utilizados no cálculo da concentração de proteínas baseado em uma equação de reta de uma curva padrão de albumina sérica bovina. Para elaboração da curva padrão de proteína utilizamos as seguintes concentrações de albumina: 0,05 mg/mL; 0,1 mg/mL; 0,15 mg/mL; 0,2 mg/mL.

A determinação da quantidade das proteínas relacionadas à via de degradação proteica miofibrilar (MuRF-1 e Atrogin-1) conforme a técnica de Western Blotting foi feita com anticorpo para proteína total. Após avaliação do conteúdo de proteínas de cada amostra, 20µg de proteínas totais por *slot* do gel foram separadas por eletroforese de acordo com seu peso molecular, utilizando gel poliacrilamida 12% (SDS-PAGE). Feita essa separação, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BIORAD) a 40 volts por 4 horas. Ligações inespecíficas dos anticorpos foram inibidas incubando a membrana por 18 horas à temperatura ambiente em solução de bloqueio (pH 7,5, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20; T-TBS) acrescida de 5% albumina bovina sérica (BSA), sob agitação constante. Posteriormente as membranas foram incubadas overnight (12 horas) a 4°C, sob agitação constante, e foi adicionado o anticorpo primário anti-MURF-1 (sc-27642, Santa Cruz, 1:500) ou anti-MAFbx (sc-27645, Santa Cruz, 1:500) diluído na solução de bloqueio. Ao final desse período de incubação, as membranas foram lavadas em T-TBS 3 vezes, por 10 minutos cada, e incubadas com anticorpo secundário donkey anti-goat conjugado com peroxidase (sc-2020, Santa Cruz, 1:15000), também diluído em solução de bloqueio em temperatura

ambiente por 1 hora. Após o término do período de incubação, as membranas foram novamente lavadas em T-TBS 3 vezes, por 10 minutos cada, e então incubadas com a solução de revelação (luminol; SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate System – Pierce Biotechnology) por 1 minuto e imediatamente seguido de leitura da quimiluminescência através da autoradiografia (Macrotec Mx-2). O filme foi revelado e as intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica (UN-Scan-it Gel 6.1) com auxílio do programa Scion Image (Scion Corporation).

Após a primeira revelação, as membranas foram novamente lavadas e submetidas a novo bloqueio como descrito anteriormente. Após bloqueio, as membranas foram novamente incubadas em um dos anticorpos primários anti- α -tubulina (DM1A, Santa Cruz 1:100) e secundários conjugados com peroxidase Goat anti-mouse (Jackson Immunoresearch, 1:40000), respectivamente, seguido por revelação como descrito anteriormente.

5.8 Medidas de desfecho e definição das variáveis

5.8.1 Variáveis independentes:

- De interesse: Estado nutricional dos animais (normonutridos e desnutridos) e Paralisia Cerebral experimental
- De controle: Idade e peso corporal das gestantes e sexo dos filhotes.

5.8.2 Variáveis dependentes:

- Peso corporal das gestantes nas três semanas de gestação e de lactação;
- Peso corporal dos filhotes no dia do nascimento e nos dias de análise de atividade locomotora;
- Distância percorrida, velocidade média, potência média, gasto de energia, tempo parado, número de paradas, relação tempo/número de paradas, tempo nas áreas 1, 2 e 3 da atividade locomotora dos filhotes aos 8, 14, 17, 21 e 28 dias de vida pós-natal;
- Expressão de proteína miofibrilar MuRF-1 e Atrogin-1 do músculo sóleo aos 29 dias de vida pós-natal.

5.9 Análise estatística

Foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados. Após a confirmação da distribuição normal foram feitas as análises estatísticas.

Para os dados de peso corporal das mães e dos filhotes e da atividade locomotora foi feita uma análise de variância Two-Way com comparações múltiplas (TWRM, Two-Way Repeated Measures), tendo o tempo e os grupos experimentais como fatores. Para analisar o peso corporal dos filhotes e dos músculos aos 29 dias de vida e a análise de proteínas miofibrilares foi realizado o teste ANOVA Two-Way, também tendo o tempo e os grupos experimentais como fatores.

O teste *Post Hoc* utilizado em todas as análises foi o teste de Tukey. Os valores estão expressos em Média e Erro Padrão da Média (EPM). Apenas o gráfico de peso corporal das mães foi demonstrado por gráfico de seguimento, sendo os demais dados apresentados em gráfico de colunas. A significância estatística foi considerada com nível crítico de 5% em todos os casos. Os dados foram analisados através do software SigmaStart® versão 3.5 e os gráficos feitos no Prisma® 7.0.

6. RESULTADOS

6.1 Efeitos da asfixia na indução da paralisia cerebral em ratos: uma revisão sistemática

Este artigo será submetido para publicação na Revista *Brain & Development*, conceito A2 para a área 21 da CAPES.

INTRODUÇÃO

A Paralisia cerebral (PC) em humanos é um grupo de desordens motoras e posturais não progressivas, estáticas e permanentes, devido a insultos no sistema nervoso central na fase de maturação estrutural e funcional do cérebro¹⁻⁶. As lesões podem ocorrer no período pré-, peri ou pós natal, já que o desenvolvimento cerebral é contínuo ainda nos dois a cinco primeiros anos de vida da criança⁶.

A PC pode ser o resultado de uma ou mais etiologias, sendo difícil determinar a causa na maioria dos indivíduos⁶. Fatores de risco neonatais podem ser a gestação abaixo de 32 semanas, baixo peso ao nascer (menor que 2.500g), crescimento intrauterino retardado, hemorragia intracraniana, trauma⁴, lesão da substância branca periventricular devido à vulnerabilidade dos oligodendrócitos imaturos antes das 32 semanas de gestação causando leucomalácia periventricular ou hemorragia intraventricular⁶⁻⁷, desnutrição e infecções⁸. Durante o parto, as principais causas são de asfixia e dificuldades respiratórias, além das infecções já mencionadas^{2,6}. Os fatores pós-natais mais vistos como etiologia em crianças com PC são meningite bacteriana, encefalites virais, hiperbilirrubinemia e quedas⁴.

Em torno de 70 a 80% das causas de PC ocorrem por complicações na fase pré-natal e em recém-nascidos prematuros, alguns por causas ainda desconhecidas^{4,7}. Cerca de 6% dos casos são por danos causados durante o parto, como asfixia⁴, e esta responde por 10 a 20% dos casos de PC^{9,10}.

A área cerebral afetada reflete diretamente nas incapacidades resultantes⁶, sendo algumas áreas mais susceptíveis que outras, mas o córtex motor cerebral está diretamente afetado². Estudos explicam que acontecem lesões no motoneurônio superior, reduzindo o input cortical aos tratos reticuloespinal e

corticoespinal, afetando o controle motor e levando à fraqueza e controle muscular anormal², mas também podem ocorrer lesões nos núcleos da base¹¹. Dessa forma, a PC é caracterizada por inabilidade em controlar funções motoras, gerando assim um efeito negativo no desenvolvimento global da criança⁶.

A literatura sobre os métodos de indução da paralisia cerebral em animais mostra que existem maneiras diversas de produzir tal condição, como a indução de processos inflamatórios (com, por exemplo, a injeção de lipopolissacarídeos – LPS), hipóxia-isquemia, anóxia neonatal e restrição sensório-motora, mas uma intervenção está, geralmente, associada à outra¹²⁻¹⁷. Em seu estudo, Coq e cols¹³ verificaram que dois episódios de asfixia em ratos no nascimento levaram a alterações tanto no tecido músculo esquelético quanto na organização do mapa cortical na área sensitiva primária – S1. Strata e cols¹² encontraram mudanças pequenas no comportamento motor e nas características corticais da área motora primária – M1. Outros pesquisadores usaram a hipóxia-isquemia perinatal para provocar lesões como atrofia do hipocampo, córtex motor e estriado, mas as alterações motoras observadas foram sutis e transitórias^{18,19}.

O objetivo deste estudo é apresentar o resultado de revisão sistemática que reúna os estudos que utilizam a asfixia (anóxia ou hipóxia-isquemia) como indução de Paralisia Cerebral em ratos, para verificar se este método é suficiente para provocar alterações semelhantes e duradouras como a Paralisia Cerebral em Humanos.

MÉTODOS

Estratégia de busca

A pesquisa na literatura foi realizada em Julho de 2014 nas bases de dados eletrônicas PubMed/MedLine (National Library of Medicine/ Medical Literature Analysis and Retrieval System Online), Lilacs (Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde), ScIELO (Scientific Eletronic Library Online), Cochrane Library e SCOPUS. A pesquisa focou em estudos experimentais que utilizaram a asfixia (anóxia ou hipóxia-isquemia) perinatal para produzir um modelo de Paralisia Cerebral em ratos, usando a “AND” na combinação dos descritores MESH “hypoxia-ischemia”, “anoxia” (anóxia), “asphyxia”, “Cerebral Palsy”, “Rats”, “Animal models” e “Experimental models”, ou seus respectivos descritores do DECS

(Hipóxia-isquemia, Anóxia, Asfixia, Paralisia Cerebral, Ratos, Modelos animais e Modelos experimentais). Não houve restrição do ano nem da língua de publicação dos artigos.

Critérios de inclusão

Para selecionar os artigos que entraram nesta revisão de literatura, os seguintes critérios de inclusão foram estabelecidos: a) Estudos experimentais apenas com ratos; b) Intervenção da asfixia realizada apenas no período neonatal (nascimento até final da lactação); c) Estudos que utilizaram apenas a asfixia num mesmo animal (anóxia ou hipóxia-isquemia).

Critérios de exclusão

Foram excluídos estudos que aplicaram a asfixia no período gestacional ou após a fase neonatal, que apenas utilizaram animais que combinaram asfixia com outra intervenção e que o método estava confuso ou impossível ser replicado pelos métodos apresentados.

Avaliação dos artigos

A avaliação metodológica dos estudos foi realizada por pontos específicos que interferiam na validade interna dos estudos experimentais, de acordo com Hooijmans et. al.²⁰: controle laboratorial sobre a temperatura, ciclo claro/escuro, nutrição e habitação, aleatorização dos grupos e avaliação do estudo por um comitê de ética.

Sobre o protocolo de asfixia, foram considerados o método utilizado, o tempo, a frequência e a idade do animal no momento da aplicação.

Os desfechos verificados foram: Análise de Marcha e Habilidades Motoras, Registros Eletrofisiológicos do Córtex, Análises histológicas, Análises Bioquímicas, Marcos do desenvolvimento e Avaliação Física.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A pesquisa inicial nas bases de dados mostrou 14 artigos na Lilacs, 37 artigos na PubMed/MedLine, 4 artigos na ScIELO e 48 artigos na SCOPUS e 73 artigos da Cochrane Library. Destes, 1 artigo da ScIELO e 5 artigos da SCOPUS estavam repetidos. Após análise dos títulos e abstracts, os artigos encontrados na

Cochrane Library foram excluídos por não se tratarem de estudos experimentais, assim como 31 artigos da PubMed/MedLine, 12 artigos da Lilacs e 37 artigos da SCOPUS, que eram estudos não-experimentais ou com outros animais, restando, no total, 17 artigos incluídos previamente. Após completa avaliação destes, 10 não preencheram os critérios de inclusão e/ou se enquadravam nos critérios de exclusão, finalizando então com 7 artigos, como apresentado na Figura 1.

Em relação à avaliação metodológica dos estudos, os artigos estão listados na Tabela 1, com a presença ou ausência dos pontos de validade interna. Dos 5 artigos incluídos, 4 obtiveram 100% de validade interna enquanto 3 artigos obtiveram 66%, 50% e 33%, respectivamente.

As características das amostras analisadas e o protocolo de asfixia utilizado dos artigos incluídos nesta revisão estão resumidos na Tabela 2. Dos artigos analisados, 5 aplicaram anóxia com o uso de gás Nitrogênio (N₂) e 2 realizaram hipóxia-isquemia com Nitrogênio associado à oclusão da artéria carótida comum.

A relação entre as variáveis analisadas e os resultados dos 7 artigos estão descritas na tabela 3.1 para estudos que realizaram anóxia nos animais, e na tabela 3.2 para os estudos que provocaram hipóxia-isquemia.

Na análise dos parâmetros de padrão de marcha e habilidades motoras (balanço e coordenação) foram encontradas divergências nos estudos aqui relacionados. Strata et al.¹² e Marcuzzo et al.¹⁵ não encontraram diferenças entre os grupos Controle (C) e Anóxia Perinatal (AP), mas apenas sutis variações nos padrões de marcha, como tendência a redução da atividade exploratória, lentidão na marcha e articulação do joelho mais elevada no grupo AP. Em contrapartida, os estudos de Stigger et al.^{16,23} demonstraram pior padrão de pisada e da fluência de marcha e prejuízo do balanço e coordenação no grupo AP, mesmo sem alterar a distância percorrida e tempo de movimentação quando comparado com o grupo C. Ainda assim, Stigger et al.¹⁶ encontrou semelhança entre os grupos na análise da função sensório-motora das patas posteriores. Esta contradição de resultados entre os autores pode ser fundamentada devido a diferenças metodológicas dos estudos, onde os animais do grupo AP que apresentaram diferenças em relação aos animais Controle passaram mais tempo em anóxia, embora esta tenha sido realizada apenas uma vez. Takada e cols¹⁷ provocaram apenas um episódio de anóxia em ratos com dois dias de vida durante 25 minutos e encontraram alterações significativas no cérebro dos animais, semelhantes às alterações humanas

provocadas por asfixia. Ito²⁴ também provocou anóxia por 25 minutos em ratos com dois dias e encontrou prejuízos na capacidade de aprendizagem destes. Assim, uma simples alteração neste modelo pode ser suficiente para provocar lesões mais expressivas nestes parâmetros. Ambos os grupos (C e AP) apresentaram scores de locomoção maiores que os grupos com Restrição sensório-motora (RSM) e Anóxia Perinatal associada à restrição sensório-motora (AP+RSM), tanto para análise da marcha^{12,15} quanto das habilidades motoras¹⁶, sendo um indicativo de que a associação dos tratamentos (restrição sensório-motora + anóxia perinatal) reproduz déficits maiores e significantes. Quando foi realizado o procedimento de Hipóxia-isquemia, os autores encontraram redução da atividade locomotora comparando com o grupo Controle²¹⁻²².

As áreas (mm²) de representação dos registros eletrofisiológicos do córtex cerebral nas áreas motora primária (M1) e sensitiva primária (S1) foram semelhantes entre os grupos C e AP aos 50 de vida pós-natal¹²⁻¹³. Houve apenas aumento da área cerebral do grupo AP para a estimulação cutânea e do movimento dos dedos¹³. Os animais submetidos a restrição associada à anóxia, no entanto, demonstram desorganizações maiores no córtex S1 da área relacionada aos pés, estimulação cutânea e do movimento dos dedos comparando com os grupos C e AP¹³. A anóxia apenas não foi suficiente para produzir alterações duradouras e de forma ampla no encéfalo dos animais.

Na análise histológica, foi encontrado maior número de fibras musculares no isquiotibial, menor no quadríceps e discreta degeneração da cartilagem articular do joelho e tornozelo no grupo AP em relação ao grupo controle. No entanto, os músculos quadríceps, isquiotibial e tríceps sural demonstraram maior número de fibras musculares e menor degeneração da cartilagem articular no grupo AP comparado com os demais grupos experimentais (RMS e AP+RSM)¹³. Estes resultados indicam que ocorre maior flexão do joelho dos animais do grupo AP em relação aos controles, causando hipertrofia dos isquiotibiais e atrofia do quadríceps. Isto provavelmente está associado a achados anteriores em que ocorre maior elevação da articulação do joelho nesses animais como movimento compensatório da marcha¹². No estudo de Stigger et al.¹⁶, nenhuma diferença foi encontrada entre C e AP em relação à área de secção transversa, distribuição dos tipos de fibras e comprimento e densidade dos sarcômeros, tanto para o músculo sóleo quanto para o tibial anterior. Em contrapartida, os grupos restritos apresentaram redução da

densidade e aumento do comprimento dos sarcômeros, alteração dos tipos de fibras musculares e atrofia no músculo sóleo. A anóxia associada à restrição promove danos musculares maiores, possivelmente pelo desuso, levando à atrofia muscular severa a qual leva a grande comprometimento da marcha dos animais.

Maior número de células da glia foi visto no grupo AP sobre o grupo C. O número de neurônios no córtex sensorial primário (S1) foi semelhante entre os dois. Em relação aos demais grupos experimentais (RSM e AP+RSM), A e AP apresentaram maior quantidade de neurônios¹⁵. Ainda não se sabe se as células da glia desempenham papel neuroprotetor ou regenerativo do tecido cerebral, mas há possibilidade deste aumento do número de células gliais nos animais anóxicos se dar por este motivo¹⁵. Para a hipóxia-isquemia, houve atrofia do hipocampo, estriado e córtex sensório-motor comparando com o grupo C²¹.

Em testes de marcos do desenvolvimento não houve diferença entre os grupos C e AP^{15,23}. Os grupos restritos, com ou sem anóxia, demonstraram atraso nos mesmos testes quando comparados aos grupos C e AP¹⁵. Estes resultados reforçam um elevado grau de lesões quando os procedimentos de anóxia e restrição sensório-motora estão associados, mas quando aplicada apenas a anóxia, não há alterações.

Em análises bioquímicas dos animais (parâmetros inflamatórios e oxidativos), autores não encontraram diferença entre os grupos AP e C para TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), SOD (superóxido desmutase) e CAT (catalase), mas observaram aumento da expressão de IL-1 (Interleucina 1) no córtex cerebral²³. Isto pode ser um indicativo de que a IL-1 esteja envolvida na cascata de inflamação, levando a danos cerebrais perinatais e possível desenvolvimento da Paralisia Cerebral. Estudos anteriores encontraram aumento da expressão da IL-1 em cérebros lesionados no período perinatal através da hipóxia-isquemia ou exposição ao LPS, que é uma forma de indução de inflamação^{25,26}.

Na avaliação física, a hipóxia-isquemia demonstrou déficit sensório-motor e neurológico nos testes de rotarod^{21,22}. A análise do peso corporal não foi diferente entre animais controle e anóxicos^{12,15}. O grupo AP demonstrou moderada espasticidade dos músculos que controlam os dedos das patas posteriores comparando com os animais controles, entretanto, os grupos RSM e AP+RSM apresentaram maior resistência ao movimento passivo¹². Os grupos restritos também tiveram atrofia muscular, menor ganho de peso e extensão anormal dos

membros em relação ao grupos C e AP¹⁵. A espasticidade nos animais restritos foi maior que nos animais anóxicos, o que pode explicar a maior degeneração da cartilagem articular também nos animais que associavam a anóxia à restrição¹³.

CONCLUSÃO

Por meio dos estudos desta revisão sistemática, concluímos que a asfixia através da hipóxia-isquemia nos animais leva a desordens semelhantes à Paralisia Cerebral humana em relação ao desenvolvimento sensório-motor, de áreas encefálicas (como o hipocampo, estriado e córtex sensório-motor) e redução da atividade locomotora. Em contrapartida, a asfixia provocada pela anóxia perinatal seguindo os protocolos destes estudos provoca pouca ou nenhuma alteração, não sendo suficiente para produzir fenótipos semelhantes à Paralisia Cerebral humana quando aplicada de forma isolada. Neste caso, a associação com outras intervenções ou apenas a alteração de protocolo de anóxia é recomendada para reprodução de um modelo eficaz de estudo.

É importante ressaltar que este estudo pode nortear a realização de novos estudos experimentais sobre as repercussões da paralisia cerebral sobre parâmetros ainda não observados. As análises experimentais são viáveis e permitem observações a curto e longo prazo, bem como análises moleculares e celulares muitas vezes não permitidas em humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mancini MC, Fiúza PM, Rebelo JM, Magalhães LC, Coelho ZA, Paixao ML, Gontijo AP, *et al.* Comparison of functional activity performance in normally developing children and children with cerebral palsy. *Arq Neuropsiquiatr.* 2002; 60 (2 B):446-52.
2. Koman LA, Smith BP, Shilt JS. Cerebral Palsy. *Lancet.* 2004; 363:1619-31.
3. Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P, Leviton A, Paneth N, Dan B, *et al.* Executive Committee for the Definition of Cerebral Palsy. Proposed definition and classification of Cerebral Palsy, April 2005. *Dev Med Child Neurol.* 2005; 47(8):571-76.
4. Krigger KW. Cerebral Palsy: An Overview. *Am Fam Physician.* 2006; 73(1):91-100.
5. Jones MW, Morgan E, Shelton JE. Cerebral Palsy: Introduction and Diagnosis (Part I). *J Pediatr Health Care.* 2007; 21(3):146-52.
6. Chan G, Miller F. Assessment and Treatment of Children with Cerebral Palsy. *Orthop Clin N Am.* 2014; 45:313-25.
7. Johnston MV, Hoon Jr AH. Cerebral palsy. *Neuromolecular Med.* 2006; 8(4):435-50.
8. Wang X, Rousset CI, Hagberg H, Mallard C. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2006; 11(5):343-53.
9. Blair E. Epidemiology of cerebral palsies. *Orthop Clin N Am.* 2010; 41:441-55.
10. Colver A, Fairhurst C, Pharoah POD. Cerebral Palsy. *Lancet.* 2014; 383:1240-49.
11. Novacheck TF, Gage JR. Orthopedic management of spasticity in cerebral palsy. *Childs Nerv Syst.* 2007; 27(9):1015-31.
12. Strata J, 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(1): 141-56.
13. Coq JO, Strata F, Russier M, Safadi FF, Merzenich MM, Byl NN, Barbe MF. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. *Exp Neurol.* 2008; 210:95-108.
14. Marcuzzo S, Dutra MF, Stigger F, Nascimento PS, Ilha J, Kalil-Gaspar PI, *et al.* Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: Walking pattern and soleus quantitative histology. *Brain Res.* 2008; 1222:129-40.

15. Marcuzzo S, Dutra MF, Stigger F, Nascimento PS, Ilha J, Kalil-Gaspar PI, *et al.* Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. *Brain Dev.* 2010; 32(4):323-31.
16. 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. *Exp Neurol.* 2011; 228:183-91.
17. Takada SH, Sampaio CAG, Allemandi J, Ito PH, Takase LF, Nogueira MI. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and FOS immunoreactivity. *J Neurosci Methods.* 2011; 198:62-69.
18. Lubics A, Reglodi D, Tamás A, Kiss P, Szalai M, Szalontary, L, *et al.* Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behav Brain Res.* 2005; 157(1):157-65.
19. Robinson S, Petelenz K, Li Q, Cohen ML, Dechant A, Tabrizi N, *et al.* Developmental changes induced by graded prenatal systemic hypoxic-ischemic insults in rats. *Neurobiol dis.* 2005; 18(3):568-81.
20. Hooijmans CR, Lenaars M, Ritskes-Hoitinga M. A Gold Standard Publication Checklist to Improve the Quality of Animal Studies, to Fully Integrate the Three Rs, and to Make Systematic Reviews More Feasible. *ATLA.* 2010; 38:167-82.
21. Jansen EM, Low WC. Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behav Brain Res.* 1996; 78:189-94.
22. Quinzaños-Fresnedo J, Coronado-Zarco R, Arch-Tirado E, Verduzco-Mendoza A, Valle-Cabrera GD, Alfaro-Rodriguez A. Efectos neurológicos de la ligadura de la carótida común izquierda e hipoxia inducida en ratas neonatas. *Cir Cir.* 2008; 76(2):119-26.
23. Stigger F, Lovatel G, Marques M, Bertoldi K, Moysés F, Elsner V, *et al.* Inflammatory response and oxidative stress in developing rat brain and its consequences on motor behavior following maternal administration of LPS and perinatal anoxia. *Int J Dev Neurosci.* 2013; 31:820-27.
24. Ito PH. Avaliação comportamental de ratos submetidos à Anóxia Neonatal [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.
25. Zhai QH, Futrell N, Chen FJ. Gene expression of IL-10 in relationship to TNFalpha, IL-1beta and IL-2 in the rat brain following middle cerebral artery occlusion. *J. Neurol. Sci.* 1997; 152:119–124.
26. Rousset CI, Chalon S, Cantagrel S, Bodard S, Andres C, Gressens P *et al.* Maternal exposure to PLS Induces Hypomyelination in the Internal Capsule and Programmed Cell Death in the Deep Gray Matter in Newborn Rats. *Pediatr Res.* 2006; 59(3):428-33.

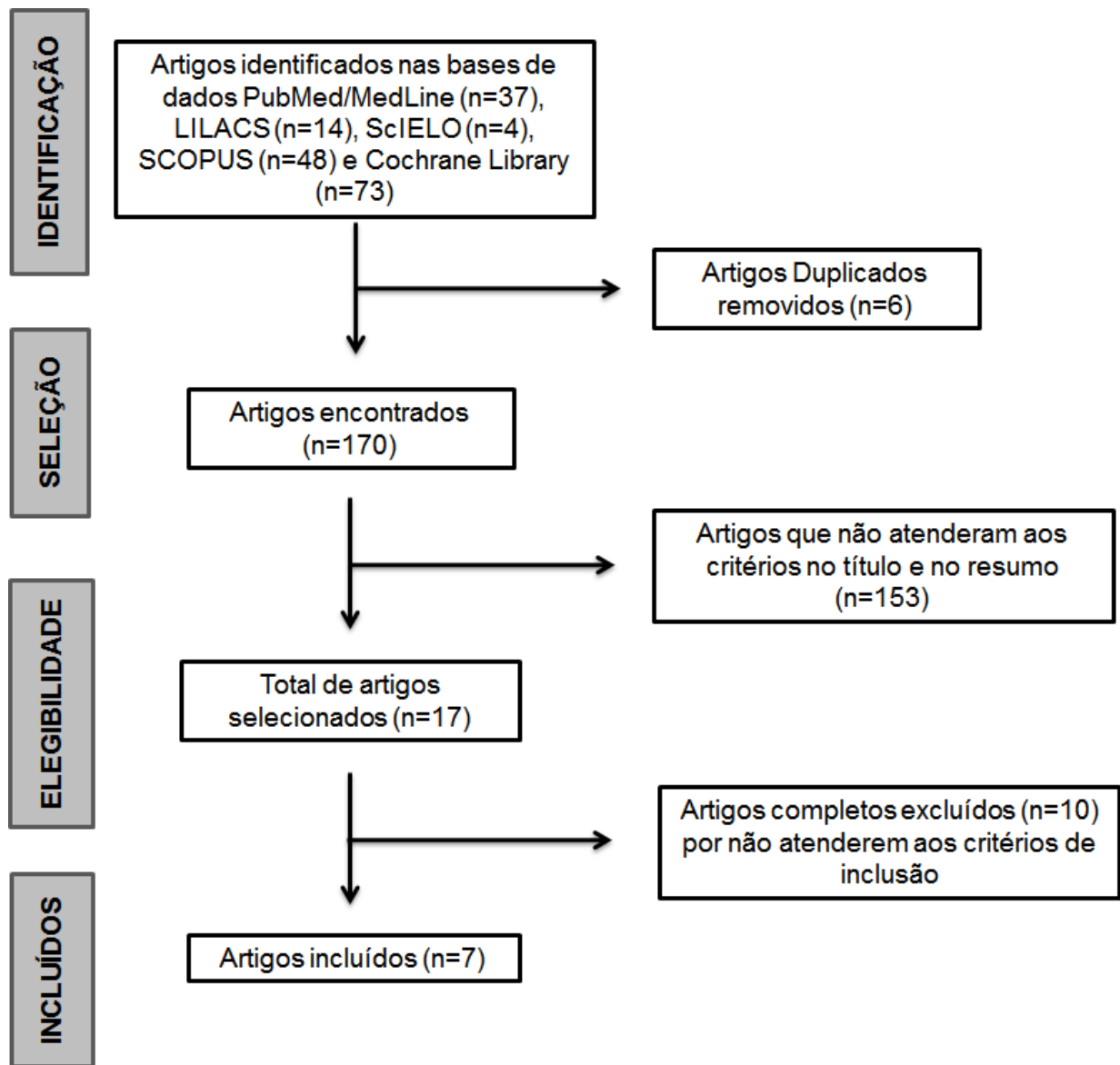


Figura 1: Fluxograma das etapas de busca e seleção dos artigos para a Revisão Sistemática.

Tabela 1: Critérios de avaliação da qualidade metodológica dos artigos incluídos na Revisão Sistemática, segundo Hooijmans et al²⁰.

Autor/Ano	Controle da Temperatura	Ciclo claro/escuro	Nutrição (Água e Ração)	Habitação (Alojamento)	Randomização dos grupos	Aspectos Éticos
Jansen e Low, 1996 ²¹	-	+	+	+	-	-
Strata et al, 2004 ¹²	-	-	-	-	+	+
Quinzaños-Fresnedo et al, 2008 ²²	+	+	+	+	+	+
Coq et al, 2008 ¹³	-	+	+	+	+	+
Marcuzzo et al, 2010 ¹⁵	+	+	+	+	+	+
Stigger et al, 2011 ¹⁶	+	+	+	+	+	+
Stigger et al, 2013 ²³	+	+	+	+	+	+

(+) Variável identificada; (-) Variável não identificada.

Tabela 2: Características dos estudos elegíveis e o protocolo de asfixia utilizado em cada artigo, em ordem cronológica.

Autor/ano	Espécie	Amostras: Grupo (n)	Sexo (n total)	Idade de sacrifício	Protocolo de Asfixia			
					Método	Tempo	Frequência	Idade
Jansen e Low, 1996	Wistar	C (15) HI (19)	M e F (34)	4 – 5 meses	Oclusão da artéria carótida comum direita + N ₂ (92%) Vazão: NI	150 min	1 sessão	P7
Strata et al, 2004	Sprague- Dawley	C (17) AP (18) RSM (22) AP+RSM (22)	NI (79)	50 dias	N ₂ (100%) Vazão: NI	12 min	2 sessões	P0 e P1
Quinzaños- Fresnedo et al, 2008	Wistar	C (5) S (5) HI (5)	M e F (15)	42 dias	Oclusão da artéria carótida comum esquerda + N ₂ (92%) Vazão: NI	100 min	1 sessão	P7
Coq et al, 2008	Sprague- Dawley	C (7) AP (7) RSM (6) AP+RSM (8)	NI (28)	99 dias	N ₂ Vazão: NI	12 min	2 sessões	P0 e P1
Marcuzzo et al, 2010	Wistar	C (14) AP (16) RSM (14) AP+RSM (12)	M (56)	52 dias	N ₂ (100%) Vazão: 9 l/min	12 min	2 sessões	P0 e P1

(Continuação)

Autor, Ano	Espécie	Amostras: Grupo (n)	Sexo (n total)	Idade do Sacrifício	Protocolo de Asfixia			
					Método	Tempo	Frequência	Idade
Stigger et al, 2011	Wistar	C LPS AP RSM AP+LPS R+LPS AP+RSM AP+RSM+LPS	M (57)	45 dias	N ₂ (100%) Vazão: 9 l/min	20 min	1 sessão	P0
Stigger et al, 2013	Wistar	C (13) A (14) LPS (14) A+LPS (13)	M (54)	0 dia e 29 dias	N ₂ (100%) Vazão: 9 l/min	20 min	1 sessão	P0

(C) Controle; (AP) Anóxia Perinatal; (RSM) Restrição sensório-motora; (LPS) Lipopolissacarídeo; (S) Sham; (HI) Hipóxia-isquemia; (NI) Não informado; (M) Machos; (F) Fêmeas; (N₂) Nitrogênio; (P) Pós-natal (a idade pós-natal é indicada pelo valor ao lado). (l) litros; (min) minutos.

Tabela 3.1: Características dos estudos elegíveis que utilizaram anóxia em termos de variáveis analisadas.

Autor, ano	Análise de marcha e Habilidades motoras	Registros eletrofisiológicos do córtex	Análise histológica	Parâmetros bioquímicos	Testes de marcos de Desenvolvimento	Avaliação física
Strata et al, 2004	Ø # ↓ (p<0,00001)	Ø	NA	NA	NA	Ø # peso corporal (p<0,00001) # ↓ resistência ao movimento passivo (p<0,00001)
Coq et al, 2008	NA	Ø pele e pés das patas posteriores * ↑ estimulação cutânea e do movimento dos dedos (p<0,05) # ↓ área cortical para os pés (NI)	* # tipos de fibras musculares (p<0,001). * ↑ degeneração articular do joelho (NI)	NA	NA	NA
Marcuzzo et al, 2010	Ø # ↓ (p<0,001)	NA	* ↑ nº céls. da glia S1 (p<0,01) # ↓ nº de neurônios S1 (p<0,05);	NA	Ø # Atraso de ±3 dias (p<0,001)	Ø # peso corporal (p<0,001) # ↓ ganho de peso, ↑ atrofia muscular, extensão anormal dos membros (NI).
Stigger et al, 2011	* ↓ # ↓	NA	AST, distribuição dos tipos de fibras e comprimento e densidade dos sarcômeros: Ø # (p<0,05)	NA	NA	NA
Stigger et al, 2013	* AP ↓ balanço e coordenação (p<0,01). Ø Distância percorrida	NA	NA	Ø * ↑ IL-1 (p=0,05)	Ø	NA

(NA) Não Avaliado; (NI) Valor de p Não Informado; (Ø) Nenhuma diferença significativa entre os grupos C (Controle) e AP (Anóxia Perinatal); (*) Diferença significativa do grupo AP em relação ao grupo C; (#) Diferença significativa dos grupos RSM (Restrição Sensorio-motora) e AP+RSM quando comparados com os grupos C e AP. (↓) Redução; (↑) Aumento; (AST) Área de Secção Transversa; (IL-1) Interleucina 1.

Tabela 3.2: Características dos estudos elegíveis que utilizaram hipóxia-isquemia em termos de variáveis analisadas.

Autor,ano	Análise de marcha e Habilidades motoras	Registros eletrofisiológicos do córtex	Análise histológica	Parâmetros bioquímicos	Testes de marcos de Desenvolvimento	Avaliação física
Jansen e Low, 1996	* (p<0,05)	NA	* atrofia (hipocampo, estriado, córtex sensório-motor) (p<0,05)	NA	NA	* déficit sensório-motor (p<0,05)
Quinzaño S-Fresnedo et al, 2008	*	NA	NA	NA	NA	* déficit neurológico (p<0,05)

HI = hipóxia-isquemia. (NA) Não Avaliado; (*) Diferença significativa entre os grupos C e HI.

6.2 Efeitos deletérios da associação da desnutrição com a paralisia cerebral em ratos

Este artigo será submetido para publicação na Revista *European Journal of Nutrition*, conceito A1 para a área 21 da CAPES.

INTRODUÇÃO

A Paralisia Cerebral (PC) é definida como uma síndrome complexa que compreende um grupo de distúrbios do movimento e da postura que causam limitação da atividade. É uma lesão estática, não progressiva e permanente, desenvolvida através de agressões ao sistema nervoso ainda em desenvolvimento^{1,2,3}. A prevalência global da PC está estável desde os últimos 40 anos, afetando 2 a 3,5 crianças a cada 1000 nascidos vivos^{4,5}. Em países subdesenvolvidos ou em vias de desenvolvimento essa incidência pode aumentar devido às condições favoráveis para ocorrência de problemas crônicos como a PC⁶.

Os efeitos patológicos da PC podem ser mutáveis ao longo do tempo^{4,7}. O desenvolvimento cerebral ainda é contínuo até os 5 anos de vida da criança. Assim sendo, as lesões a este órgão podem ocorrer nas fases pré-natal, perinatal ou pós natal³. Existem vários fatores de risco que podem desencadear a PC. Dentre eles, estão gestação abaixo de 32 semanas, peso ao nascer menor de 2.500g, malformações, gestação múltipla, traumas, hemorragias intracranianas, leucomalácia periventricular, infecções, desnutrição, hipertensão materna, asfixia, dificuldades respiratórias, meningite bacteriana, hiperbilirrubinemia e até mesmo quedas^{1,8,9,10}. Os efeitos da PC no músculo esquelético são geralmente acompanhados de alterações de sensação, cognição, comunicação, percepção e comportamento⁵, afetando a capacidade exploratória, de linguagem, de aprendizado e independência⁹. Os sinais característicos da PC são espasticidade, aumento de reflexos, atrofia e fraqueza muscular, distúrbios do movimento, ataxia, rigidez e marcha característica em tesoura^{2,8}.

As disfunções alimentares são frequentemente encontradas em crianças com PC devido à interação de vários fatores, como disfunção do controle motor oral, maturação neurológica anormal e má postura ao sentar devido à instabilidade do tronco¹¹. A dificuldade de deglutição é encontrada em 99% das crianças com PC

severa¹². Além disso, vômitos e contraturas na ATM são comuns nesses indivíduos, o que torna o processo de alimentação demorado e desagradável, contribuindo ainda mais pelo mal estado nutricional^{2,7}.

O músculo esquelético é bastante plástico e capaz de se adaptar às diversas condições impostas ao longo da vida¹². A manutenção da massa muscular pode ser afetada pela PC e pelos fatores nutricionais^{13,14}. A redução da massa muscular encontrada em indivíduos com PC e/ou desnutrição pode acontecer pelo aumento da degradação ou redução da síntese de proteínas¹⁴. O sistema Ubiquitina-proteossoma é a principal via de degradação muscular, principalmente sob condições de restrição proteica ou energética¹⁵. Este sistema envolve enzimas responsáveis por marcar com várias moléculas de ubiquitina à proteína substrato, e assim esta é reconhecida pelo proteossoma S26, que degrada a proteína ubiquitinada em vários peptídeos¹⁶. Três componentes enzimáticos são necessários na marcação da proteína: E1, enzimas ativadoras de ubiquitina; E2, enzimas transportadoras de ubiquitina; e E3, a proteína ubiquitina ligase. Estas são responsáveis por acoplar a ubiquitina na proteína-alvo. Atrogin-1/Maf-bx (Muscle Atrophy F-box) e MuRF-1 (Muscle Ring Finger-1) são conhecidas como E3 ligases encontradas em modelos de desuso, imobilização, desnervação e suspensão do membro^{16,17,18}.

O presente estudo utiliza um modelo de Paralisia Cerebral em ratos^{19,20,21,22,23} associado à desnutrição perinatal para investigar os efeitos da desnutrição sobre a atividade locomotora e a expressão de proteínas miofibrilares MuRF-1 e Atrogin-1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manipulação dos animais e formação dos grupos experimentais

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição do Departamento de Nutrição da UFPE – Recife, em parceria com o Laboratório de Educação Física e Plasticidade Fenotípica do Centro Acadêmico de Vitória (CAV) da Universidade Federal de Pernambuco – Vitória de Santo Antão.

Foram utilizados 75 ratos da linhagem Wistar, acondicionados em Biotério de ciclo normal (luzes acesas das 6h às 18h), temperatura ambiente de 23°C ± 2°C, com livre acesso à água e alimentação.

Após a confirmação da gestação, as ratas gestantes foram separadas em dois grupos de acordo com a dieta fornecida: grupo normonutrido (N, 17% proteína, n=9) e grupo desnutrido (D, 8% de proteína, n=12). No momento do nascimento dos filhotes, os mesmos foram selecionados aleatoriamente em ninhadas de 8 filhotes por mãe e divididos em dois subgrupos para cada grupo de mães : para as normonutridas, os filhotes foram divididos em Normonutrido Controle (NC, n=16) e Normonutrido PC (NPC, n=21); para desnutridas, os filhotes foram divididos em Desnutrido Controle (DC, n=20) e Desnutrido PC (DPC, n=18).

O peso corporal (gramas, g) das mães foi verificado a cada 3 dias no período da gestação e da lactação e os filhotes foram pesados (g) ao nascer e nos dias de análise de atividade locomotora.

Anóxia Perinatal e Restrição Sensório-motora

No dia do nascimento (P0) e no primeiro dia de vida pós-natal (P1) os animais dos grupos PC foram submetidos à anóxia. Para tal, foram colocados por 12 minutos em uma câmara hermética a $36,5^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, mergulhada em banho-maria e acoplada a um cilindro de gás nitrogênio 99,9% com fluxo de 9 l/min. Após o período de anóxia, os animais foram retirados da câmara e com a recuperação da coloração rósea e da frequência respiratória normal, foram recolocados junto com suas respectivas mães.

A restrição sensório-motora aconteceu do 2º ao 28º dia de vida pós-natal (P2 ao P28). Para este procedimento foi utilizada uma órtese de epóxi de acordo com o tamanho do animal. Os filhotes eram mantidos com o quadril e membros posteriores em extensão durante 16 horas por dia, das 20h às 12h do dia seguinte, de forma que não prejudicasse a eliminação de urina e fezes. Nas 8 horas restantes a livre movimentação o animal foi permitida.

Análise da atividade Locomotora

Aos 8, 14, 17, 21 e 28 dias de vida pós-natal os animais foram colocados no centro de um campo aberto circular com diâmetro de 1m a livre movimentação foi filmada por um período de 5 minutos cada. A filmagem ocorria entre as 18h e 20h, período em que se encontravam sem a órtese. Da filmagem foram extraídos os dados de distância percorrida (metros, m), velocidade média (metros por segundo, m/s), potência média (miliwatts, mW), tempo parado (segundos, s), número de

paradas, relação tempo parado pelo número de paradas, tempo em cada área do campo(s) e gasto de energia total (Joules, J).

Retirada de amostras musculares

No 29º dia pós-natal, os animais foram decaptados, suas patas posteriores dissecadas e os músculos sóleos imediatamente pesados e congelados após a retirada. O peso de cada músculo (Massa Muscular, MM, em gramas) foi mensurado e normalizado utilizando o peso corporal (Massa Corporal, MC, em gramas) para obter a relação MM/MC. O músculo sóleo da pata direita foi congelado com dióxido de carbono solidificado a -78,5°C e armazenados a -80 °C, usados para avaliação da expressão de proteínas de degradação protéica.

Análise de Proteínas Miofibrilares

O músculo sóleo congelado foi homogeneizado em tampão de extração (pH 7,5; 10mM de EDTA, Trisma base 100mM, Pirofosfato de Na 10mM, Fluoreto de Na 100mM, PMSF 2mM, Ortovanadato de Na, Aprotinina 0,1mg/ml). Após esse período, foi centrifugado a 11000RPM (Rotações Por Minuto) a 4°C durante 30min e o sobrenadante foi separado para a dosagem do conteúdo total de proteínas utilizando o método proposto por Bradford²⁴, baseado em uma equação de reta de uma curva padrão de albumina sérica bovina como padrão. Amostras contendo 20µg de proteínas totais por *slot* do gel foram separadas por eletroforese de acordo com seu peso molecular, utilizando gel poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e em seguida transferidas para uma membrana de Nitrocelulose (BIORAD) a 40 volts por 4 horas. Proteínas foram bloqueadas incubando a membrana por 18 horas à temperatura ambiente em solução de bloqueio (pH 7,5, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20; T-TBS) acrescida de 5% albumina bovina sérica (BSA), sob agitação constante. Posteriormente as membranas foram incubadas overnight (12 horas) a 4°C, sob agitação constante, e foi adicionado o anticorpo primário anti-MURF-1 (sc-27642, Santa Cruz, 1:500) ou anti-MAFbx (sc-27645, Santa Cruz, 1:500) diluído na solução de bloqueio. Ao final desse período de incubação, as membranas foram lavadas em T-TBS 3 vezes, por 10 minutos cada, e incubadas com anticorpo secundário donkey anti-goat conjugado com peroxidase (sc-2020, Santa Cruz, 1:15000), também diluído em solução de bloqueio em temperatura ambiente por 1 hora. Após o término do período de incubação, as membranas foram novamente

lavadas em T-TBS 3 vezes, por 10 minutos cada, e então incubadas com a solução de revelação (luminol; SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate System – Pierce Biotechnology) por 1 minuto e imediatamente seguido de leitura da quimiluminescência através da autoradiografia (Macrotec Mx-2). O filme foi revelado e as intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria óptica (UN-Scan-it Gel 6.1) com auxílio do programa Scion Image (Scion Corporation). A normalização da determinação do conteúdo total das proteínas analisadas foi realizada pela coloração das membranas com Anti- α -tubulina (DM1A, Santa Cruz 1:100). Os anticorpos primários foram identificados pelos anticorpos secundários conjugados com peroxidase Goat anti-mouse (Jackson Immunoresearch, 1:40000), seguido por revelação como descrito anteriormente.

Análise Estatística

Todos os dados passaram no teste de normalidade de Kolmogorov-smirnov. Para os dados de peso corporal das mães e dos filhotes e da atividade locomotora foi feita uma análise de variância Two-Way com comparações múltiplas (TWRM, Two-Way Repeated Measures). Para analisar o peso corporal dos filhotes e dos músculos aos 29 dias de vida e a análise de proteínas miofibrilares foi realizado o teste ANOVA Two-Way. O teste *Post Hoc* utilizado em todas as análises foi o teste de Tukey. Os valores estão expressos em Média e Erro Padrão da Média (EPM). A significância estatística foi considerada com nível crítico de 5% em todos os casos.

RESULTADOS

Não houve diferença entre os grupos N e D com relação ao peso corporal materno durante a gestação. No período de lactação, também não houve diferença entre os grupos analisados, embora se observe redução mais expressiva do peso corporal das mães desnutridas, revelando na terceira semana peso corporal 17% menor em relação às mães normonutridas. (Figura 1).

O peso corporal dos animais ao nascer não diferiu entre os diferentes grupos. A partir do 8º dia, os animais DPC apresentaram redução do peso corporal em relação aos animais NPC ($p \leq 0,021$), sendo esta redução cada vez mais expressiva com o avanço da idade. Aos 28 dias, estes animais chegam a pesar 57% do peso corporal dos animais NPC ($p < 0,001$). A partir dos 14 dias os animais de ambos os grupos com PC apresentaram peso corporal menor em relação ao seu respectivo

grupo controle ($p < 0,001$). Também a partir dos 14 dias é possível observar o efeito da desnutrição, com redução do peso corporal do grupo DC em relação ao NC ($p < 0,001$), e a influência da PC experimental na redução do peso corporal quando comparados os grupos NC *versus* NPC ($p < 0,001$). Aos 28 dias, o grupo NPC apresentou aproximadamente 70% do peso corporal do grupo NC. (Figura 2).

Na análise da atividade locomotora foi observado que a distância percorrida de ambos os grupos NPC e DPC reduziu a partir do 17º dia, quando comparadas com ambos os grupos NC e DC ($p \leq 0,004$). Não houve diferença entre NPC e DPC, nem entre NC e DC (Figura 3A).

A velocidade média apresentou os mesmos resultados que a distância percorrida, mas foi a partir do 14º dia de vida dos animais que houve diferença de ambos os grupos PC's em relação a ambos os grupos Controle ($p \leq 0,008$) (Figura 3B).

A energia total gasta pelos animais do grupo DPC foi menor a partir do 17º dia em relação aos grupos NC e DC ($p \leq 0,007$), e apenas aos 28 dias foi menor também em relação ao grupo NPC ($p = 0,008$). O grupo NPC apresentou redução do gasto de energia a partir do 17º dia comparando com seu grupo controle normonutrido ($p < 0,001$), e a partir dos 21 dias quando comparado também com o grupo DC ($p < 0,001$) (Figura 4A).

A potência média apresentou-se de forma idêntica ao gasto de energia (valores de p também iguais ao do gasto de energia total) (Figura 4B).

O tempo parado para o grupo DPC não foi diferente do grupo NPC nem do grupo DC em nenhuma das idades. Já os animais do grupo NPC apresentaram maior tempo de imobilidade aos 17 ($p = 0,038$) e 28 dias ($p = 0,027$) em relação ao seu controle. (Figura 5A).

Para o parâmetro 'número de paradas', o grupo DPC apresentou maior quantidade de pausas aos 14 ($p < 0,001$) e 17 ($p = 0,01$) dias em comparação com o grupo NPC, bem como do 14º ($p = 0,01$) ao 17º ($p < 0,001$) dia em relação aos animais DC. Os animais NPC apresentaram maior quantidade de pausas apenas aos 8 dias ($p = 0,011$) em relação aos animais NC (Figura 5B).

Na relação tempo parado/número de paradas houve redução apenas aos 8 dias de vida, no qual os grupos NPC, DC e DPC apresentaram menos tempo em cada parada comparando com o grupo NC ($p < 0,001$) (Figura 5C).

Aos 14 ($p \leq 0,015$) e 17 dias ($p \leq 0,024$) de vida o grupo DPC apresentou aumento do tempo de permanência na área central do campo em relação aos demais grupos (Figura 6A). Os animais NPC passaram mais tempo na área 1 apenas aos 14 dias, comparando com os animais NC ($p = 0,023$). Consequentemente, o inverso do parâmetro anterior ocorre para o tempo de permanência na área 3, onde o grupo DPC permaneceu por menos tempo aos 14 ($p < 0,001$) e 17 ($p < 0,05$) dias de vida comparando com os grupos NPC, DC e DPC. O grupo NPC, também contrariamente ao parâmetro anterior, apresentou menos tempo na região periférica do campo aberto aos 14 dias comparando com o grupo NC ($p = 0,007$) (Figura 6C). Aos 8 dias, o tempo de permanência na área intermediária do campo foi maior nos grupos NPC e DPC em relação aos seus respectivos controles, NC ($p = 0,027$) e DC ($p = 0,008$). O grupo DPC apresentou aumento no tempo de permanência na área 2 aos 14 dias quando comparado com os grupos NC ($p = 0,004$) e NPC ($p < 0,05$) (Figura 6B).

Sobre a massa do músculo sóleo, os grupos NPC, DC e DPC apresentaram redução da mesma aos 29 dias em relação ao grupo NC ($p < 0,001$). Mas o grupo DPC também obteve redução do peso muscular em relação aos grupos NPC ($p < 0,001$) e DC ($p = 0,002$) (Figura 7A).

Assim como o resultado da análise anterior, a massa corporal aos 29 dias de todos os grupos foi menor em relação ao grupo NC ($p < 0,001$). O grupo DPC também obteve menor massa corporal sobre os grupos NPC ($p < 0,001$) e DC ($p < 0,001$) (Figura 7B).

Quando foi feita a normalização da massa muscular pela massa corporal, os grupos DC, NPC e DPC apresentaram menor relação MM/MC comparando com o grupo NC ($p < 0,05$). Da mesma forma, o grupo DPC apresentou menor relação MM/MC sobre os grupos NPC ($< 0,001$) e DC ($p < 0,001$) (Figura 7C).

Na análise de proteínas miofibrilares aos 29 dias, o MuRF-1 apresentou aumento da expressão no grupo DPC em relação ao grupo NPC ($p = 0,002$). Este grupo apresentou menor expressão de MuRF-1 comparando com o grupo NC ($p = 0,015$) (Figura 8A). Para a expressão de Atrogin-1 não houve diferença entre os grupos (Figura 8B).

DISCUSSÃO

Ratos provindos de mães com dieta baixa em proteína podem nascer com peso corporal normal, como encontrado em nosso estudo, devido à compensação da placenta em manter o aporte nutricional adequado. No período de gestação de ratas com restrição proteica, a placenta aumenta de tamanho como uma tentativa de adaptação à condição imposta, melhorando a transferência de nutrientes da mãe para o feto e, assim, minimizando os efeitos da desnutrição materna e a restrição do crescimento do filhote²⁵.

Como demonstrado neste e em outros estudos^{19,20,21, 22} a Paralisia Cerebral experimental promoveu redução do peso corporal nos animais com o avançar da idade. Strata e cols¹⁹ relatam que o peso corporal de animais que sofreram a PC experimental chega a ser até 70% do peso corporal dos animais controles. No nosso estudo, o peso corporal dos animais NPC correspondeu a aproximadamente 70% do peso corporal dos animais NC aos 28 dias de vida. Segundo Fung e cols¹¹, esta redução do peso corporal pode estar muito relacionada com as disfunções alimentares encontradas em indivíduos acometidos com esta patologia. Marcuzzo e cols²² afirmam que também é possível que a atrofia muscular e a redução da densidade óssea possam contribuir com a redução do peso corporal nos animais submetidos ao modelo experimental de PC.

A desnutrição ocorrida durante o período de lactação também pode afetar no ganho de peso corporal dos filhotes pelo fato de mães alimentadas com uma dieta pobre em proteínas possuírem a glândula mamária em menor tamanho e escasso volume de leite^{26,27}. Este fato leva à redução da oferta de nutrientes à prole²⁸, influenciando no crescimento dos filhotes já que sua alimentação foi prejudicada. Vários estudos demonstraram que animais que sofreram desnutrição proteica no período gestacional e/ou lactacional apresentam redução do seu peso corporal^{29,30,31}, dados igualmente identificados no presente estudo, em que os animais DC apresentaram menor peso corporal a partir dos 14 dias, comparando com o grupo NC. Segundo Belluscio e cols³², ratos desnutridos durante esses períodos apresentam, a partir da primeira semana de vida, em torno de 70% do peso corporal dos animais normonutridos, podendo ficar até 18% mais leves em fases posteriores. E, como encontrado no presente estudo, se a oferta nutricional

continuar baixa mesmo após o desmame, o peso corporal dos animais ainda pode reduzir.

Verificamos que a desnutrição simultânea à PC experimental provocou redução ainda maior na evolução do peso corporal. O peso destes indivíduos chegou a ser 43% menor em relação aos animais NPC. Nossos dados corroboram com achados do estudo de Sanches e cols³³, em que animais com desnutrição após episódios de Hipóxia-isquemia apresentaram menor peso corporal em relação aos apenas hipóxico-isquêmicos. Estes resultados indicam que o fator nutricional pode ser agravante na redução do peso corporal de indivíduos com Paralisia Cerebral.

A distância percorrida pelos animais no presente estudo apresentou-se reduzida a partir dos 14 dias no grupo DPC em relação ao seu controle DC. Já a partir dos 17 dias ambos os grupos NPC e DPC obtiveram distância percorrida menor em relação a ambos os controles, NC e DC. A velocidade média, por sua vez, apresentou neste estudo os mesmos resultados que a distância percorrida. Este fato pode ser explicado devido à relação direta da velocidade com a distância que o animal caminha. Além disso, o tempo parado semelhante em todos os grupos também contribuiu com o aumento da velocidade, por ser inversamente proporcional a esta. É sabido que indivíduos com PC apresentam maior cansaço, fadiga muscular e ineficiência da marcha, causando perda de deambulação^{2, 8}. Segundo Stigger e cols²³, o músculo sóleo de animais submetidos à PC experimental apresentou maior número de fibras tipo II e redução das fibras tipo I. Sendo o músculo sóleo predominantemente postural, ele apresenta maior quantidade de fibras tipo I e após longo período de desuso apresenta nítidas mudanças dos tipos das fibras²³. O aumento do cansaço e da fadiga muscular pode estar diretamente relacionado com a maior distribuição de fibras tipo II no músculo de indivíduos com PC, visto que esta fibra é mais rápida e, portanto, mais fatigável que as fibras do tipo I^{23,34,35}. Assim sendo, há perda da deambulação com redução da distância percorrida e da velocidade média nesses animais, independente do estado nutricional.

A desnutrição proteica durante a gestação e a lactação leva a mudanças severas nos circuitos neurais e causa deficiências na musculatura esquelética, como redução no diâmetro e número das fibras, hipotonia e déficit de força muscular³⁶, aumentando o cansaço desses indivíduos. No nosso estudo, a associação da desnutrição e paralisia cerebral levou à perda de deambulação ainda mais agravada

nos animais, com o aumento do número de paradas entre os 14 e 17 dias. Dessa forma, o aumento do número de pausas pode estar diretamente relacionado com ocorrência da fadiga em animais desnutridos, somado à alteração dos tipos de fibras na PC (menor quantidade de fibras tipo I e maior quantidade das fibras tipo II). Como as fibras tipo II são mais fatigáveis, seria então necessário um maior número de pausas.

Marcuzzo e cols²¹ verificaram que os animais restritos apresentam padrões de marcha anormais (como elevação das patas traseiras e extensão anormal dos joelhos e tornozelos durante a marcha) com redução do comprimento da passada pelo aumento do ângulo do pé e redução de movimentos articulares. Essas alterações na coordenação da marcha têm efeito crucial no desenvolvimento da atividade locomotora dos animais submetidos à paralisia cerebral, reduzindo a distância percorrida destes. Sanches e Cols³³ verificaram que animais desnutridos anóxicos passam mais tempo na área central do campo. Dados semelhantes foram encontrados no presente estudo, onde animais DPC estiveram mais tempo na área central que na periferia do campo aberto que os demais grupos. Estes resultados demonstram a dificuldade de movimentação dos animais para as demais áreas do campo devido à coordenação defeituosa para a produção dos movimentos necessários à marcha. Embora a distância percorrida destes animais DPC seja a mesma que os NPC, a coordenação motora desses está ainda mais prejudicada, possivelmente pelo efeito associado da desnutrição. A fraqueza muscular e coordenação defeituosa dos movimentos na PC, segundo alguns estudos^{1,8,37}, podem ocorrer pela lesão do motoneurônio superior (MNS). Neste tipo de lesão há danos corticais ou de vias centrais relacionadas à motricidade, como os tratos reticuloespinal e corticoespinal. Estas lesões, por sua vez, afetam o controle motor diminuindo o número de unidades motoras efetivas, tornando o recrutamento insuficiente, desordenado e até mais lento que o normal. Como a maior força de contração está diretamente relacionada com o maior número de unidades motoras recrutadas, esse processo de lesão do MNS leva então à fraqueza muscular e ao prejuízo no controle de funções motoras³⁵. Segundo Marcuzzo e cols²¹, a anóxia perinatal pode causar rompimento dos circuitos espinais e a restrição sensório-motora também pode contribuir no desenvolvimento anormal do trato corticoespinal em ratos, porque o desenvolvimento desta via ocorre no período pós-natal.

Verificamos que a potência média e o gasto de energia total aumentaram gradativamente com as idades em todos os grupos, mas apresentaram-se reduzidas a partir dos 17 dias nos grupos NPC e DPC em relação aos grupos NC e DC. Este fato pode ser justificado como consequência da redução do peso corporal destes animais, uma vez que a potência e o gasto de energia de um corpo estão diretamente relacionados à sua massa. Outro fator que pode influenciar na redução da potência média e do gasto de energia é a velocidade média, que também é diretamente proporcional a estes parâmetros. Assim, animais com paralisia cerebral, por apresentarem menor peso corporal e velocidade média, também apresentam, portanto, menor potência e gasto energético. Barros²⁹ também verificou que a desnutrição leva à redução da potência média por afetar o peso corporal dos animais. Quando associada à PC, a desnutrição parece ter efeito mais severo na redução de potência e gasto de energia aos 28 dias, pois é nesse período em que o peso corporal dos animais DPC reduz mais de 40% em relação aos animais que possuem apenas a paralisia.

Os grupos DC, NPC e DPC apresentaram menor massa do músculo sóleo e menor massa corporal aos 29 dias de vida comparando com o grupo NC. Consequentemente, os mesmos apresentaram também, nesta idade, menor relação MM/MC, sugerindo atrofia muscular nestes grupos. Dados semelhantes foram encontrados nos estudos de Stigger e cols²³ e Marcuzzo e cols^{21,22}, em que ratos submetidos ao modelo experimental de PC apresentaram redução da área de secção transversa e atrofia do músculo sóleo. Em períodos de desnutrição, tecidos mais nobres como o encéfalo são mais bem preservados enquanto a musculatura esquelética, menos nobre, sofre mais as consequências da restrição alimentar³⁸. Além disso, como já visto, o músculo sóleo é bastante plástico e apresenta nítidas alterações após períodos prolongados de desuso²³. Uma parte da fraqueza muscular pode ser atribuída a essa redução da musculatura, devido à incapacidade de produzir níveis de torque proporcionais às suas áreas³⁹. A desnutrição hipoproteica parece ter efeito maior sobre a redução da musculatura em animais com PC da mesma forma que afeta o peso corporal destes, e assim a atrofia muscular parece ser ainda maior nestes animais.

Sobre a expressão de proteínas miofibrilares, nós verificamos que a expressão de Atrogin-1/Mafbx não esteve alterada em nenhum grupo aos 29 dias. Já a expressão de MuRF-1 reduziu no grupo NPC em relação ao grupo NC. O

controle da transcrição de MuRF-1 e Atrogin-1 é bastante complexo porque há vários fatores de transcrição que podem influenciar a expressão dessas proteínas. Dessa forma, elas podem ser ativadas sob as mais diversas condições de atrofia¹². Apesar de ambas as proteínas estarem relacionadas com a degradação muscular, as ubiquitinas-ligases MuRF-1 e Atrogin-1 desempenham papéis diferentes no músculo e são reguladas diferentemente: A função primária do MuRF-1 é desencadear a degradação em proteínas estruturais (como actina e miosina), enquanto que os substratos do Atrogin-1 são as proteínas reguladoras (como troponina e tropomiosina)⁴⁰. Assim, elas podem expressar-se de formas diferentes no mesmo músculo, como encontramos no presente estudo. Modelos animais que utilizaram desnervação, suspensão do membro ou desuso mostram que a expressão de Atrogin-1 e MuRF-1 foi alta por um período de tempo relativamente curto, em torno de 48 horas após o insulto, seguido de sustentação dessa elevação por aproximadamente 7 a 10 dias. Após esse período, houve redução gradual da expressão dessas proteínas à linha de base^{12,41,42}. Dessa forma, não se pode inferir que não houve impacto significativo de ambas as proteínas no processo de atrofia muscular¹² de animais submetidos à PC apenas pelo fato de não ter sido identificado aumento na expressão delas, já que as análises foram feitas a longo prazo. São claras as correlações entre atrofia muscular e aumento de Atrogin-1 e MuRF-1, mas a sua expressão pode ser transitória, o que pode dificultar a identificação das mudanças na expressão de forma precisa em períodos prolongados de imobilização¹⁴.

No nosso estudo, quando a desnutrição foi associada à PC, houve aumento da expressão de MuRF-1 em relação aos animais NPC, mas sem diferenças em relação ao grupo NC. Segundo alguns estudos^{43,44,45,46}, a desnutrição leva à redução do diâmetro e da área de secção transversa do músculo, do peso corporal e perda de massa muscular. Em nosso estudo, a massa do músculo sóleo dos animais DPC esteve bastante reduzida comparando com os demais grupos. Assim, a associação da desnutrição com a Paralisia Cerebral pode ter causado um efeito maior na degradação proteica que apenas a PC sozinha, e por essa razão houve maior expressão de MuRF-1 nos animais DPC.

Uma possível explicação é de que, apesar da Paralisia Cerebral isolada levar à redução da massa muscular e atrofia, este mecanismo pode estar associado a outra via de degradação que não a Ubiquitina-proteossoma, ou até mesmo outros

fatores de transcrição desta via podem ter sido afetados, alterando a expressão de MuRF-1 e Atrogin-1. Mas a desnutrição pode ativar a via ubiquitina proteossoma em animais submetidos à PC e a degradação de proteínas miofibrilares parece ser contínua, com a atrofia muscular sendo ainda mais aparente.

CONCLUSÃO

Os dados provenientes deste estudo levam à conclusão de que a Paralisia Cerebral interfere negativamente no ganho de peso corporal e no desenvolvimento da atividade locomotora e quando a desnutrição está associada os danos são ainda maiores, com aumento do cansaço e da perda de coordenação.

O aumento da expressão de MuRF-1 apenas pela PC se mostrou reduzida porque a atrofia muscular nestes indivíduos está provavelmente relacionada com outras vias de degradação ou porque outros fatores de transcrição da via foram afetados. Mas a desnutrição quando está associada a esta condição parece ativar esta via, aumentando a expressão de MuRF-1 e provocando maior atrofia muscular.

Maior expressão de Atrogin-1 não foi visualizada provavelmente por ter sido avaliada após um período prolongado de desuso, mas não se pode afirmar que esta proteína não esteve ativada no processo de degradação muscular, sendo necessária a realização de testes em fases agudas de exposição a esta patologia.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio prestado através de bolsas e auxílios, aos integrantes do Laboratório de Distúrbios do Metabolismo da Unicamp de Limeira e do Laboratório de Fisiologia da Nutrição da UFPE de Recife pelo apoio prestado durante o período da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P, Leviton A, Paneth N, Dan B, *et al.* Executive Committee for the Definition of Cerebral Palsy. Proposed definition and classification of Cerebral Palsy, April 2005. *Dev Med Child Neurol.* 2005; 47(8):571-76.
2. Krigger KW. Cerebral Palsy: An Overview. *Am Fam Physician.* 2006; 73(1):91-100.
3. Chan G, Miller F. Assessment and treatment of children with cerebral palsy. *Orthop Clin N Am.* 2014; 45:313-25.
4. Blair E. Epidemiology of cerebral palsies. *Orthop Clin N Am.* 2010; 41:441-55.
5. Colver A, Fairhurst C, Pharoah POD. Cerebral Palsy. *Lancet.* 2014; 383:1240-49.
6. Himmelmänn K. Epidemiology of cerebral palsy. *Handb Clin Neurol.* 2013; 111(3):167-67.
7. Bell KL, Boyd RN, Tweed SM, Weir KA, Stevenson RD, Davies PSW. A prospective, longitudinal study of growth, nutrition and sedentary behavior in young children with cerebral palsy. *BMC Public Health.* 2010; 10:179-90.
8. Koman LA, Smith BP, Shilt JS. Cerebral Palsy. *Lancet.* 2004; 363:1619-31.
9. Jones MW, Morgan E, Shelton JE. Cerebral Palsy: Introduction and Diagnosis (Part I). *J Pediatr Health Care.* 2007; 21(3):146-52.
10. Himmelmänn K, Ahlin K, Jacobsson B, Cans C, Thorsen P. Risk factors for cerebral palsy in children born at term. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011; 90:1070-1081.
11. Fung EB, Samson-Fang L, Stallings VA, Conaway M, Liptak G, Henderson RC, *et al.* Feeding dysfunction is associated with poor growth and health status in children with cerebral palsy. *J Am Diet Assoc.* 2002; 102:361-368-373.
12. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal Muscle Atrophy and the E3 Ubiquitin Ligases, MuRF-1 and MAAbx/Atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014; 307(6):E469-84.
13. McCarthy JJ, Esser KA. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010; 13(3):230-35.
14. Gumucio JP, Mendias CL. Atrogin-1, MuRF-1 and sarcopenia. *Endocrine.* 2013. 43(1):12—21.
15. Carbone JW, McClung JP, Pasiakos SM. Skeletal Muscle Responses to Negative Energy Balance: Effects of Dietary Protein. *Adv Nutr.* 2012; 3:119-26.

16. Teixeira VON, Filippin LI, Xavier RM. Mecanismos de perda muscular e sarcopenia. *Ver Bras Reumatol.* 2012; 52(2):247-59.
17. Bajotto G, Sato Y, Kitaura Y, Shumomura Y. Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles. *Eur J Appl Physiol.* 2011; 111(8):1815-28.
18. Delfino GB, Peviani SM, Durigan JLQ, Russo TL, Baptista IL, Ferret M, *et al.* *Am J Phys Med Rehabil.* 2012; 92(5):411-19.
19. Strata J, 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(1): 141-56.
20. Coq JO, Strata F, Russier M, Safadi FF, Merzenich MM, Byl NN, Barbe MF. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. *Exp Neurol.* 2008; 210:95-108.
21. Marcuzzo D, Dutra MF, Stigger F, Nascimento PS, Ilha, J, Kalil-Gaspar PI, *et al.* Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: Walking pattern and soleus quantitative histology. *Brain Res.* 2008; 1222:129-40.
22. Marcuzzo S, Dutra MF, Stigger F, Nascimento PS, Ilha J, Kalil-Gaspar PI, *et al.* Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. *Brain Dev.* 2010; 32(4):323-31.
23. 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. *Exp Neurol.* 2011; 228:183-91.
24. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
25. Belkacemi L, Nelson DM, Desai M, Ross MG. Maternal undernutrition influences placental-fetal development. *Biol Reprod.* 2010; 83(3):325–31.
26. Marín MC, De Tomas ME, Serres C, Mercuri O. Protein-energy malnutrition during gestation and lactation in rats affects growth rate, brain development and essential fatty acid metabolism. *J Nutr.* 1995; 125(4):1017-24.
27. Moura EG, Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep.* 2005; 25(3-4):251-69.
28. Zhan XA, Wang M, Ren H, Zhao RQ, Li JX, Tan ZL. Effect of early feed restriction on metabolic programming and compensatory growth in broiler chickens. *Poult Sci.* 2007; 86(4):654-60.

29. Barros KMFT. Desnutrição neonatal: aspectos estruturais e biomecânicos do desenvolvimento da atividade locomotora em ratos [Tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2006.
30. Silvado ED, Werneck LC. Alterations in the gastrocnemius muscle of undernourished suckling rats. *Muscle Nerve*. 2006; 34(1):72-77.
31. Freitas-Silva, SR. Desnutrição neonatal e desenvolvimento neuromuscular: avaliação da maturação da excitabilidade reflexa e da atividade locomotora em ratos [Tese]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2007.
32. Belluscio LM, Berardino BG, Ferroni NM, Ceruti JM, Cánepa ET. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. *Physiol Behav*. 2014; 129:237-54.
33. Sanches EF, Arteni NS, Spindler C, Moysés F, Siqueira IR, Perry ML, *et al*. Effects of pré- and postnatal protein malnutrition in hypoxic-ischemic rats. *Brain Res*. 2012; 1438:85-92.
34. Givon U. Muscle weakness in cerebral palsy. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2009; 43(2):87-93.
35. Mockford M, Caulton JM. The Pathophysiological Basis of Weakness in Children with Cerebral Palsy. *Pediatr Phys Ther*. 2010; 22(2):222-233.
36. Batistela E, Pereira MP, Siqueira JT, Paula-Gomes S, Zanon NM, Oliveira EB, *et al*. Decreased rate of protein synthesis, caspase-3 activity, and ubiquitin-proteosome proteolysis in soleus muscles from growing rats fed a low-protein, high-carbohydrate diet. *Can J Physiol Pharmacol*. 2014; 92:445-54.
37. Sanger TD, Delgado MR, Gaebler-Spira D, Hallet M, Mink JW, Task Force on Childhood Motor Disorders. Classification and definition of disorders causing hypertonía in childhood. *Pediatrics*. 2003; 111(1):89-97.
38. Toscano AE, Manhães-De-Castro R, Canon F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition*. 2008; 24(3):270-8.
39. Elder GCB, Kirk L, Stewart G, Cook K, Weir D, Marshall A *et al*. Contributing factors to muscle weakness in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol*. 2003; 45(8):542-50.
40. Mirzoev TM, Turtikova OV, Lomonosova YN, Nemirovskaya TL, Alekseev SM, Kovtun AL. *Dokl Biochem Biophys*. 2014; 454(1):10-12.
41. Sackeck JM, Hyatt JPK, Raffaello A, Jagoe RT, Roy RR, Edgerton VR, *et al*. Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases. *FASEB J*. 2007; 21(1):140-55.

42. Zeman RJ, Zhao J, Zhang Y, Zhao W, Wen X, Wu Y, *et al.* Differential skeletal muscle gene expression after upper or lower motor neuron transection. *Eur J Physiol.* 2009; 458:525-35.
43. Boreham CA, Watt PW, Williams PE, Merry BJ, Goldspink G, Goldspink DF. Effects of ageing and chronic dietary restriction on the morphology of fast and slow muscles of the rat. *J Anat.* 1988; 157:111-25.
44. Oliveira FLC, Oliveira ASB, Schmidt B, Amâncio OMS. Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações musculoesqueléticas na 1° e 2° gerações. *J Pediatr.* 1999; 75(5):350-6.
45. Mallinson JE, Sculley DV, Craigon J, Plant R, Langley-Evans SC, Brameld JM. Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fiber type composition in young rats. *Br J Nutr.* 2007; 98(2):292–99.
46. Fiorotto ML, Davis TA, Reeds PJ. Regulation of myofibrillar protein turnover during maturation in normal and undernourished rat pups. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 278(4):845-54.

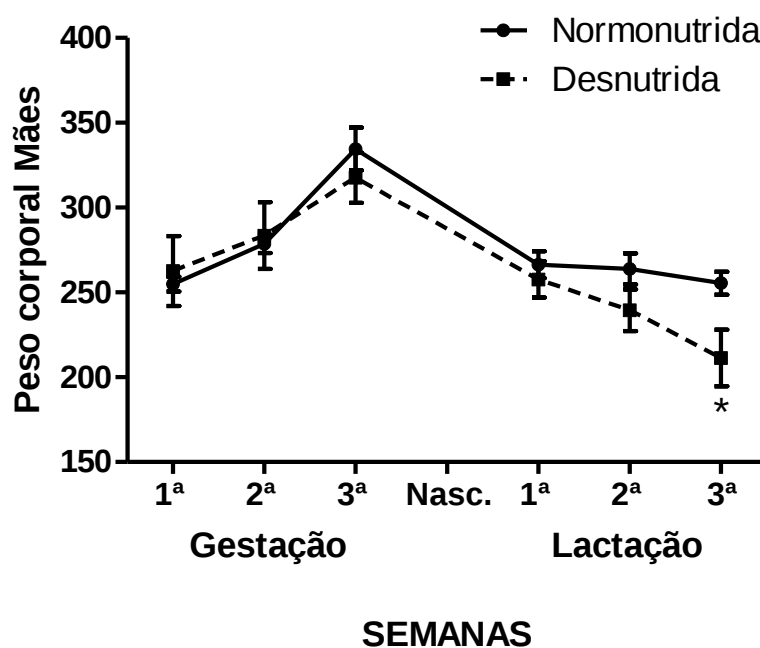


Figura 1: Evolução do peso corporal de mães normonutridas (N, n=9) e Desnutridas (D, n=12) durante as três semanas de gestação e a lactação. Os dados estão expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA Two-Way RM; Teste de Tukey. *Diferença intergrupo na mesma semana. $p < 0,05$.

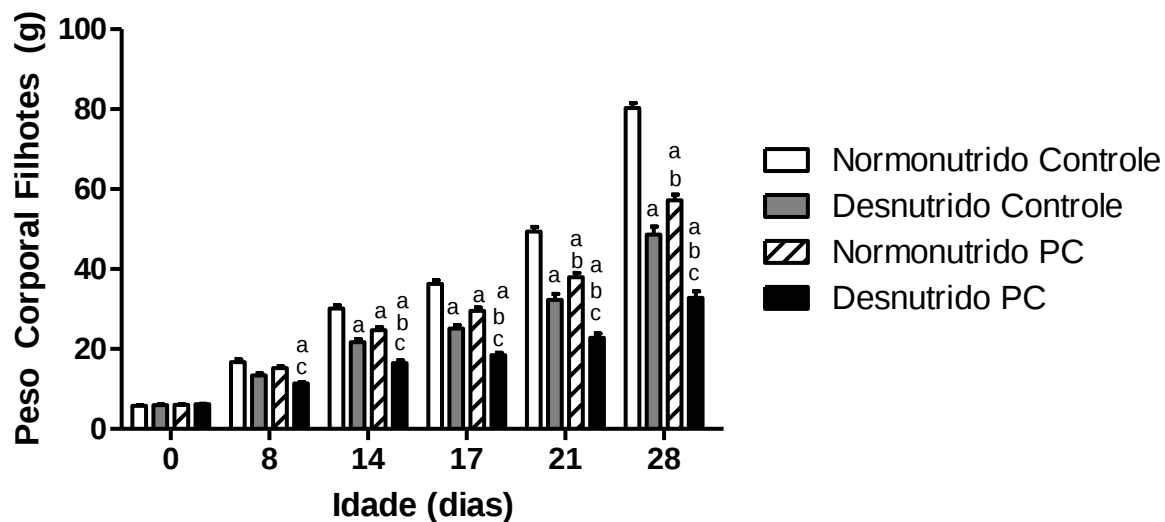


Figura 2: Evolução do peso corporal de ratos Normonutridos e Desnutridos com e sem Paralisia Cerebral no dia do nascimento e aos 8, 14, 17, 21 e 28 dias de vida. NC (n=16), DC (n=20), NPC (n=21) e DPC (n=18). Os dados estão expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA Two-Way RM; Teste de Tukey. ^aDiferença em relação ao grupo NC; ^bDiferença em relação ao grupo DC; ^cDiferença entre o grupo NPC. $p < 0,05$.

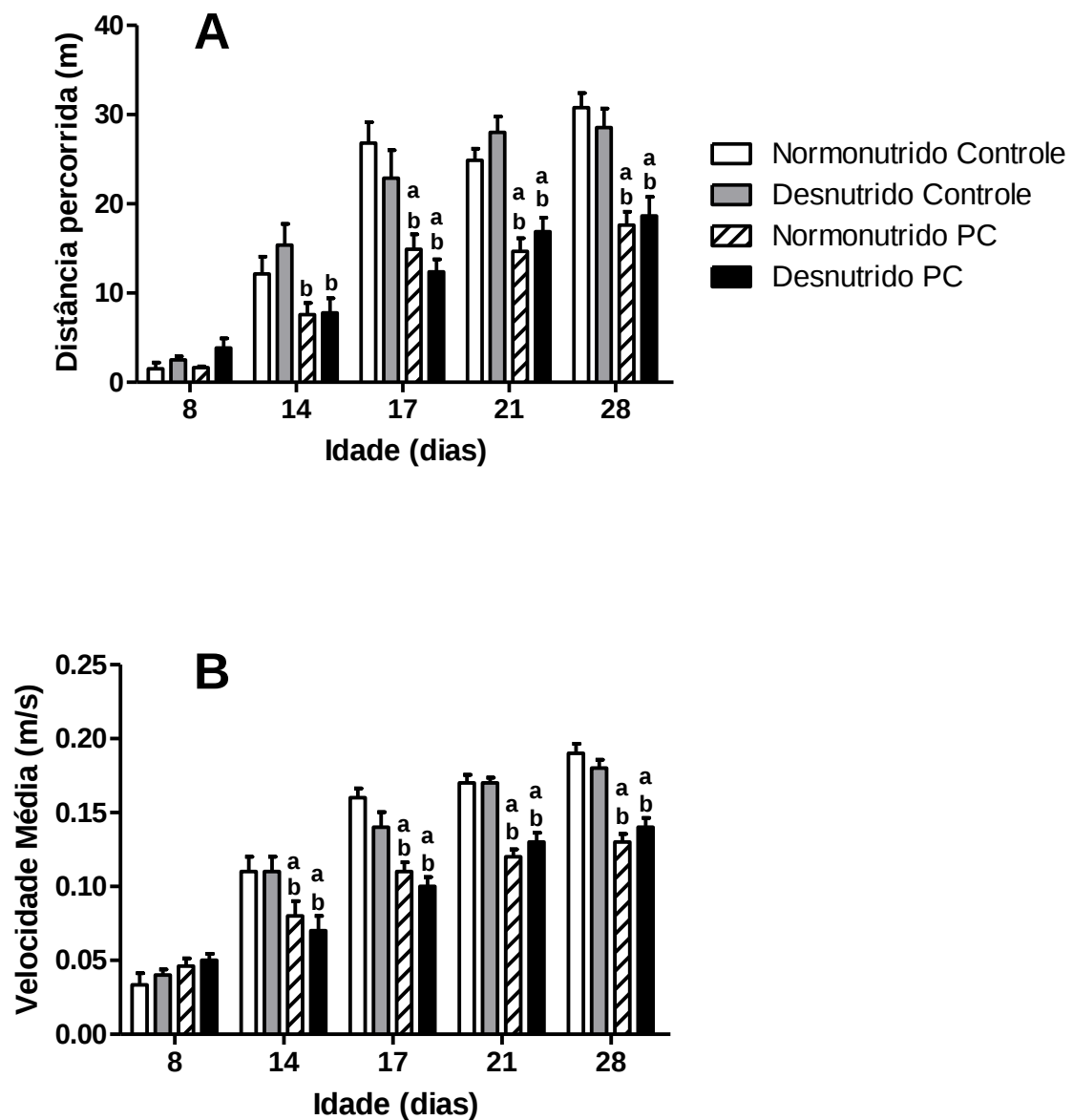


Figura 3: Evolução da Distância Percorrida (A) e Velocidade Média (B) de ratos Normonutridos e Desnutridos com e sem Paralisia Cerebral. NC (n=16), DC (n=20), NPC (n=21) e DPC (n=18). Os dados estão expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA Two-Way RM; Teste de Tukey. ^aDiferença em relação ao grupo NC; ^bDiferença em relação ao grupo DC. $p < 0,05$.

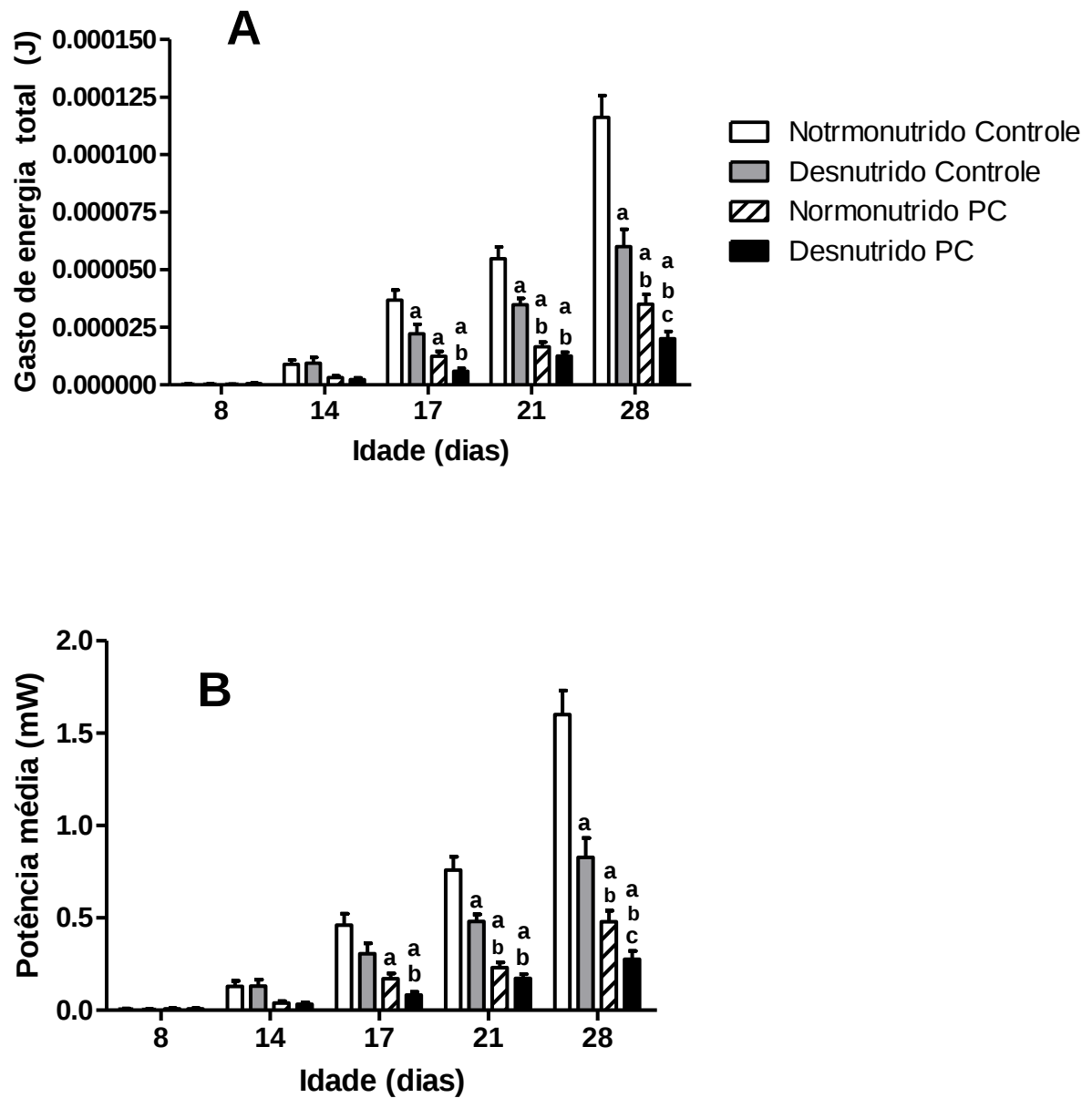


Figura 4: Evolução do Gasto de Energia (A) e da potência média (B) de ratos Normonutridos e Desnutridos com e sem Paralisia Cerebral. NC (n=16), DC (n=20), NPC (n=21) e DPC (n=18). Os dados estão expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA Two-Way RM; Teste de Tukey. ^aDiferença em relação ao grupo NC; ^bDiferença em relação ao grupo DC; ^cDiferença entre o grupo NPC. $p < 0,05$.

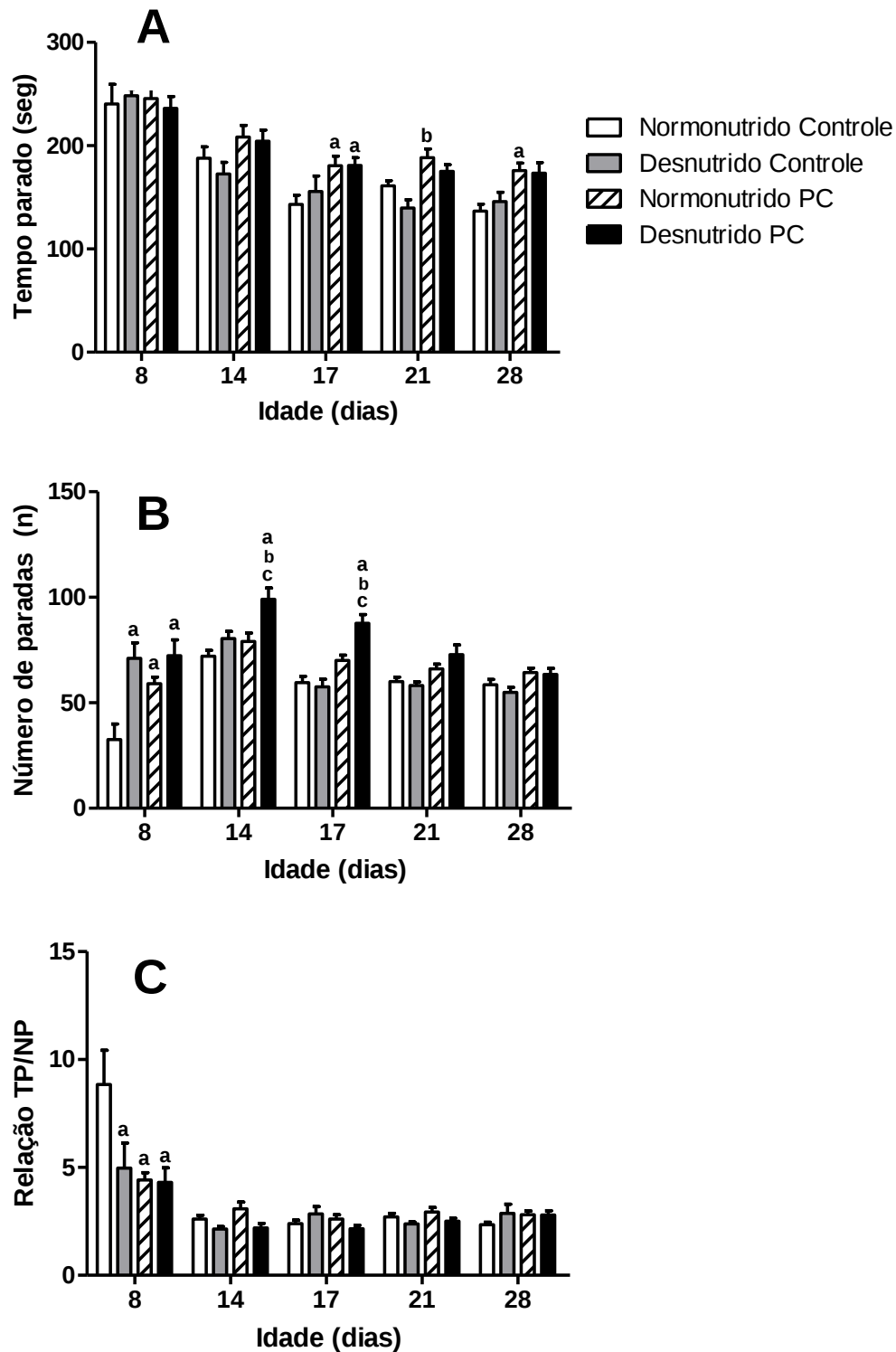


Figura 5: Evolução do Tempo parado (A), Número de paradas (B) e Relação Tempo parado/Número de paradas (C) de ratos Normonutridos e Desnutridos com e sem Paralisia Cerebral. NC (n=16), DC (n=20), NPC (n=21) e DPC (n=18). Os dados estão expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA Two-Way RM; Teste de Tukey. ^aDiferença em relação ao grupo NC. $p < 0,001$.

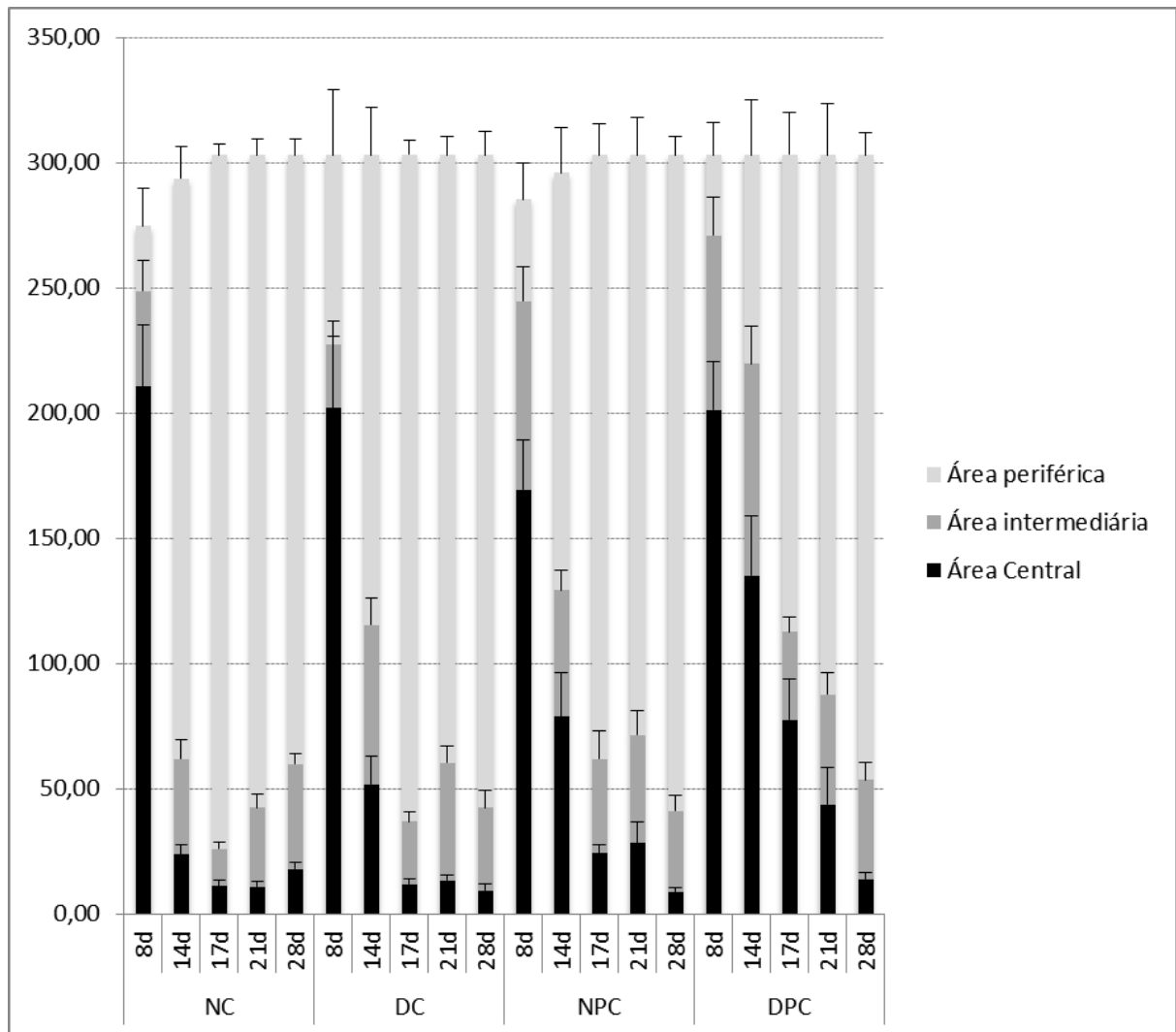


Figura 6: Evolução do Tempo nas áreas 1(central), 2 (intermediária) e 3 (periférica) de ratos Normonutridos e Desnutridos com e sem Paralisia Cerebral. NC (n=16), DC (n=20), NPC (n=21) e DPC (n=18). Os dados estão expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA Two-Way RM; Teste de Tukey. ^aDiferença em relação ao grupo NC; ^bDiferença em relação ao grupo DC; ^cDiferença entre o grupo NPC. $p < 0,05$.

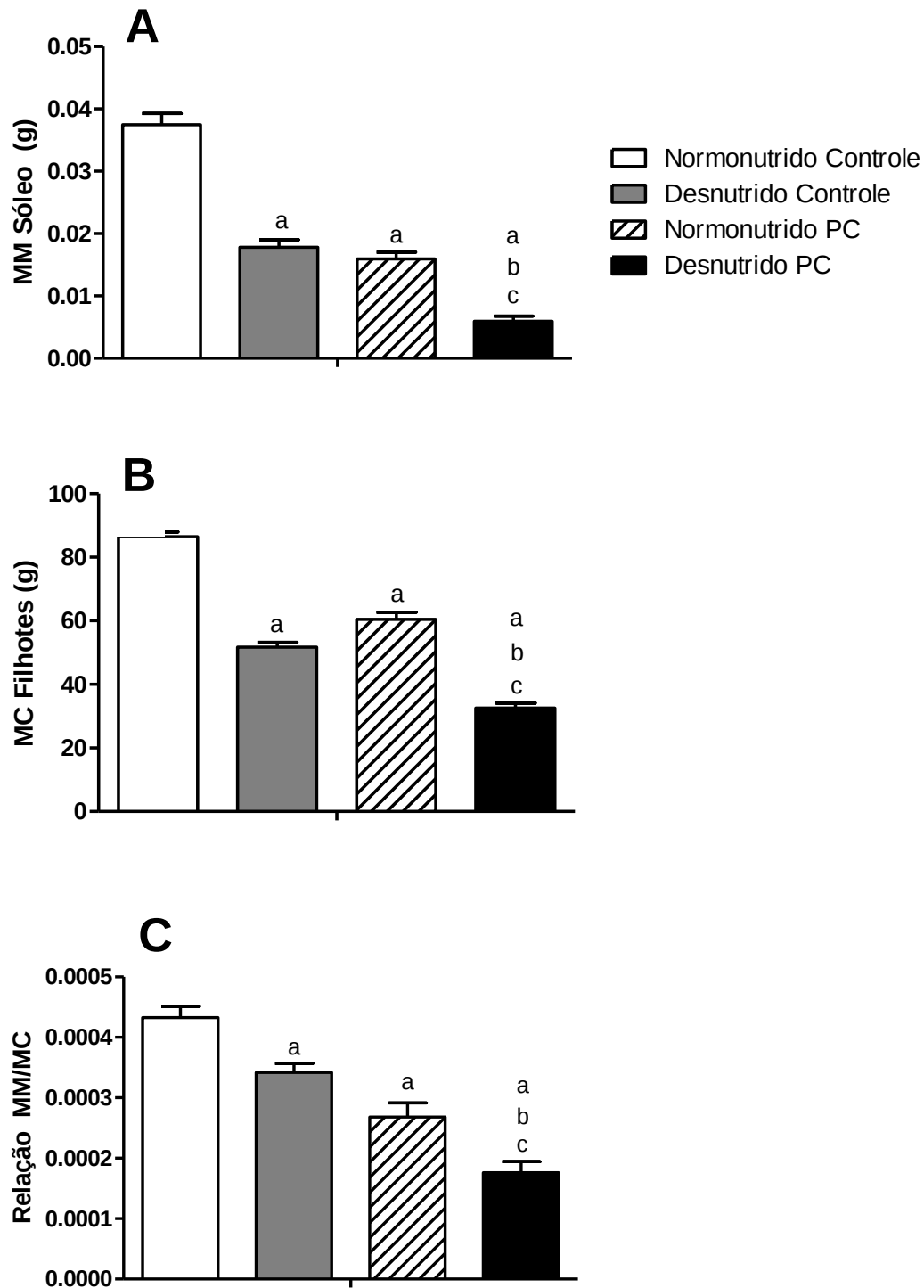


Figura 7: A = Massa do Músculo (MM) sóleo, B = Massa Corporal (MC) e C = Relação MM/MC de ratos Normonutridos e Desnutridos com e sem Paralisia Cerebral aos 29 dias de vida. NC (n=16), DC (n=20), NPC (n=21) e DPC (n=18). Os dados estão expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA Two-Way; Teste de Tukey. ^aDiferença em relação ao grupo NC; ^bDiferença em relação ao grupo DC; ^cDiferença entre o grupo NPC. $p < 0,05$.

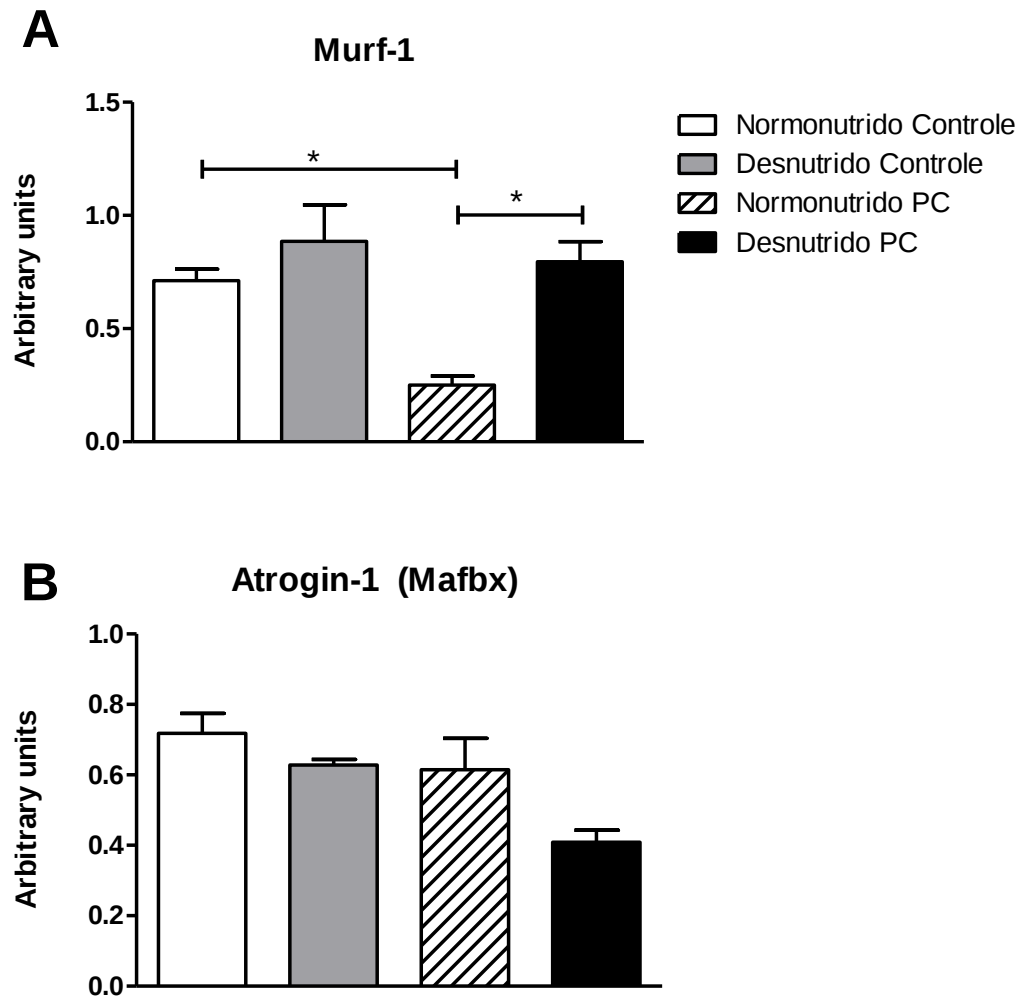


Figura 8: Expressão proteica miofibrilar de MuRF-1 (Muscle Ring Finger-1, A) e Atrogin-1 (Muscle Atrophy F-box, MAF-bx, B) no músculo sóleo de ratos Normonutridos e Desnutridos com ou sem Paralisia Cerebral aos 29 dias de vida. NC (n=16), DC (n=20), NPC (n=21) e DPC (n=18). Os dados estão expressos em Média $\pm$ EPM. ANOVA Two-Way; Teste de Tukey. *Diferença significativa entre os grupos. $P < 0,05$.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Diante dos achados, o presente estudo aponta que a Paralisia Cerebral é um insulto severo para o organismo, levando à redução da locomoção e do ganho de peso corporal, independente do estado nutricional, já que a desnutrição associada à PC não interfere na distância percorrida e na velocidade desenvolvida pelos animais.

A desnutrição associada à PC interfere negativamente no ganho de peso corporal dos filhotes, sendo indicativo de que o fator nutricional pode agravar a redução do peso em indivíduos acometidos com a Paralisia Cerebral. A redução da potência média e do gasto de energia nesses animais ocorre devido à íntima relação destes parâmetros com o peso dos animais. Esta condição de desnutrição + PC também leva à atrofia muscular mais expressiva, seguida de aumento da proteína de degradação MuRF-1, sugerindo que a desnutrição pode estar ativando a via de degradação ubiquitina-proteossoma em organismos acometidos com a Paralisia Cerebral.

Para estudos posteriores, sugere-se que seja feita uma investigação de outras vias de degradação, bem como de outros fatores de transcrição que podem estar regulando a via ubiquitina-proteossoma. Assim, os mecanismos de controle da via ubiquitina-proteossoma na desnutrição e/ou paralisia cerebral podem ser mais bem esclarecidos, a fim de entender melhor a expressão de MuRF-1 e Atrogin-1 nestas condições. Também é sugerida a investigação da expressão gênica destas proteínas. Outro passo importante é estudar este modelo de Paralisia Cerebral em animais submetidos à dieta hiperproteica e/ou hiperlipídica, para verificar se este tipo de alimentação pode prevenir, atenuar, piorar ou até mesmo não modificar as sequelas deixadas pela Paralisia Cerebral.

REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, R.S. **Efeitos da desnutrição neonatal sobre o desenvolvimento da atividade locomotora em ratos**. Trabalho de Conclusão do Curso de Fisioterapia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife-PE, 2006.
- ARAGÃO, R.S. et al. Automatic system for analysis of locomotor activity in rodents--a reproducibility study. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 192, n. 2, p. 216-221, 2011.
- BAJOTTO, G. et al. Effect of branched-chain amino acid supplementation during unloading on regulatory components of protein synthesis in atrophied soleus muscles. **European Journal of Applied Physiology**. v. 111, n. 8, p. 1815-1828, 2011.
- BARROS, K.M.F.T. et al. Neonatal malnutrition: effects on contractile and elastic properties on rat soleus muscle. In: Congrès de la Société de Biomécanique, 2004, Creteil- França. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 112, p. 154-154, 2004.
- BATISTELA, E. et al. Decreased rate of protein synthesis, caspase-3 activity, and ubiquitin-proteasome proteolysis in soleus muscles from growing rats fed a low protein, high-carbohydrate diet. **Canadian Journal of physiology and pharmacology**, v. 92, n. 6, p. 445-454, 2014.
- BAUMEISTER, W.J. et al. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. **Cell**, v. 92, n. 3, p. 367-380, 1998.
- BAX, M. et al. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. **Developmental Medicine & Child Neurology**. v. 47, n. 8, p. 571-576, 2005.
- BEDI, K.S. et al. Early life undernutrition in rats: Quantitative histology of skeletal muscles from unfed young and refed adult animals. **British Journal of Nutrition**, v.47, p.417-31, 1982.
- BELL, K.L. et al. A prospective, longitudinal study of growth, nutrition and sedentary behavior in young children with cerebral palsy. **BioMed Central Public Health**. v. 10, p. 179-190, 2010.
- BELL, M.J.; HALLENBECK, J.M. Effects of intrauterine inflammation on developing rat brain. **Journal of Neuroscience Research**, v. 70, n. 4, p. 570-579, 2002.
- BLAIR, E. Epidemiology of the cerebral palsies. **Orthopedic Clinics of North America**. v. 41, p. 441-455, 2010.
- BODINE, A.C.; BAHAR, L.M. Skeletal Muscle Atrophy and the E3 Ubiquitin Ligases, MuRF-1 and MAFbx/Atrogin-1. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 6, p. E469-484, 2014.

BOENGLER, K. et al. Prevention of the ischemia-induced decrease in mitochondrial Tom20 content by ischemic reconditioning. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 41, n. 3, p. 426-430, 2006.

BOLLINGER, L.M. et al. SMAD-3 augments FoxO-3-induced MuRF-1 promoter activity in a DNA-binding-dependent manner. **American Journal of physiology Cell physiology**, v. 307, n. 3, p. C278-287, 2014.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

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

CARBONE, J.W.; MCCLUNG, J.P.; PASIAKOS, S.M. Skeletal Muscle Responses to Negative Energy Balance: Effects of Dietary Protein. **American Society for Nutrition**, v. 3, p. 119-126, 2012.

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

CHAUDHARY, P. et al. Chronic hypobaric hypoxia mediated skeletal muscle atrophy - role of ubiquitin-proteasome pathway and calpains. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 364, p. 101-113, 2012.

CITÓ, M.C.O. et al. Reversal of cocaine withdrawal-induced anxiety by ondansetron, buspirone and propranolol. **Behavioural brain research**, v. 231, n. 1, p. 116-123, 2012.

COLVER, A.; FAIRHURST, C.; PHAROAH, P.O.D. Cerebral palsy. **The Lancet**. v. 383, p.1240-1249, 2014.

COQ, J.O. et al. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 210, p. 95-108, 2008.

COUTINHO, E.L. et al. A new model for the immobilization of the rat hind limb. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 1329-1332, 2002.

DELFINO, G.B. et al. Quadriceps Muscle Atrophy After Anterior Cruciate Ligament Transection Involves Increased mRNA Levels of Atrogin-1, Muscle Ring Finger 1, and Myostatin. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 92, n. 5, p. 411-419, 2013.

ELDER, G.C.B et al. Contributing factors to muscle weakness in children with cerebral palsy. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 45, n. 8, p. 542-550, 2003.

FIOROTTO, M.L.; DAVIS, T.A.; REEDS, P.J. Regulation of myofibrillar protein turnover during maturation in normal and undernourished rat pups. **American Journal**

of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 278, n. 4, p. 845-854, 2000.

FUNG, E.B. et al. Feeding dysfunction is associated with poor growth and health status in children with cerebral palsy. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 102, n. 3, p. 361-73.

GALLAGHER, E.A.L. et al. The effect of low protein diet in pregnancy on the development of brain metabolism in rat offspring. **The Journal of Physiology**, v. 568, n. 2, p. 553-558, 2005.

GIVON, U. Muscle weakness in cerebral palsy. **Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica**, v. 43, n. 2, p. 87-93, 2009.

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

GUMUCIO, J.P.; MENDIAS, C.L. Atrogin-1 MURF-1 and sarcopenia. **Endocrine**, v. 43, p. 12-21, 2012.

HERSHKO, A.; CIECHANOVER, A.; VARSHAVSKY, A. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. **Nature Medicine**, v. 6, n. 10, p.1073-81, 2000.

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

HIMMELMANN, K et al. Risk factors for cerebral palsy in children born at term. **ACTA Obstetricia et Gynecologica**, v. 90, n. 10, p. 1070-1081, 2011.

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

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

ITO, J. et al. Muscle histopathology in spastic cerebral palsy. **Brain & Development**, v. 18, p. 299-303, 1996.

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

JACKSON, P.K. et al. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 10, p.429-439, 2000.

JAGOE, R.T.; GOLDBERG, A.L. What do we really know about the ubiquitin-proteasome pathway in muscle atrophy? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 4, n. 3, p.183-190, 2001.

JOHNSTON, M.V.; HOON JR, A.H. Cerebral palsy. **Neuromolecular Medicine**, v. 8, n. 4, p. 435-450, 2006.

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

KARAGIOZOGLOU-LAMPOUDI, T. et al. Identification of feeding risk factors for impaired nutrition status in paediatric patients with cerebral palsy. **Acta Paediatrica**, v. 101, n. 6, p. 649-54, 2012.

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

KRÄGELOH-MANN, I.; CANS, C. Cerebral Palsy Update. **Brain & Development**, v. 31, n. 7, p. 537-544, 2009.

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

LUBICS, A. et al. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behavioural Brain Research**, v. 157, n. 1, p. 157-165, 2005.

MANCINI, M.C. et al. Comparação do desempenho de atividades funcionais em crianças com desenvolvimento normal e crianças com Paralisia Cerebral. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 60, n. 2-B, p. 446-452, 2002.

MARBINI, A.I et al. Immunohistochemical study of muscle biopsy in children with cerebral palsy. **Brain & Development**, v. 24, n. 2, p. 63-66, 2002.

MARCUZZO, S. et al. Beneficial effects of treadmill training in a cerebral palsy-like rodent model: Walking pattern and soleus quantitative histology. **Brain Research**, v. 1222, p. 129-140, 2008.

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

MCCARTHY, J.J.; ESSER, K.A. Anabolic and catabolic pathways regulating skeletal muscle. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 13, n. 3, p.230-235, 2010.

MOCKFORD, M.; CAULTON, J.M. The pathophysiological basis of weakness in children with cerebral palsy. **Pediatric Physical Therapy**, v. 22, p. 222-233, 2010.

NOVACHEK, T.F.; GAGE, J.R. Orthopedic management of spasticity in cerebral palsy. **Child's Nervous System**, v. 27, n. 9, p. 1015-1031, 2007.

OUMI, M.; MIYOSHI, M.; YAMAMOTO, T. The Ultrastructure of skeletal and smooth muscle in experimental protein malnutrition in rats fed a low protein diet. **Archives of Histology and Cytology**, v. 63, n. 5, p. 451-457, 2000.

REDDIHOUGH, D.S.; COLLINS, K.J. The epidemiology and causes of cerebral palsy. **The Australian Journal of Physiotherapy**, v. 49, n. 1, p. 7-12, 2003.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-951, 1993.

ROBERSON, R. et al. Postnatal inflammatory rat model for cerebral palsy: too different for humans. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 195, n. 4, p. 1038-1044, 2006.

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

SALEM, M. et al. Molecular characterization of muscle atrophy and proteolysis associated with spawning in rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D Genomics Proteomics**, v.1, n.2, p. 227-237, 2006.

SANGER, T.D. et al. Classification and definition of disorders causing hypertonia in childhood. **Pediatrics**. v. 111, n. 1, p. 89-97, 2003.

SERDAROGLU, A. et al.. Prevalence of cerebral palsy in turkish children between the ages of 2 and 16 years. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 48, n. 6, p. 413-426, 2006.

SILVADO, E.D.; WERNECK, L.C. Alterations in the gastrocnemius muscle of undernourished suckling rats. **Muscle & Nerve**, v. 34, n. 1, p. 72-77, 2006.

STIGGER, F. et al. Effects of fetal exposure to lipopolysaccharide, perinatal anoxia and sensorimotor restriction on motor skills and musculoskeletal tissue: implications for an animal model of cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 228, p. 183-191, 2011.

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

TAKADA, S.H. et al. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, p. 62-69, 2011.

TEIXEIRA, V.O.N.; FILIPPIN, L.I.; XAVIER, R.M. Mecanismos de perda muscular da sarcopenia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52, n. 2, p. 247-259, 2012.

TOSCANO, A.E.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 270 - 278, 2008.

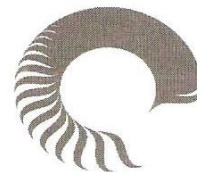
TOSO, L. et al. Inflammatory-mediated model of cerebral palsy with developmental sequelae. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 193, p. 933-941, 2005.

WANG, X. et al. Lipopolysaccharide-induced inflammation and perinatal brain injury. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 11, n. 5, p. 343-353, 2006.

ZEMAN, R.J. et al. Differential skeletal muscle gene expression after upper or lower motor neuron transection. **Pflügers Archiv: European journal of physiology**, v. 458, n. 3, p. 325-335, 2009.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 18 de março de 2013.

Ofício nº 550/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro**
Universidade Federal de Pernambuco
Núcleo de Enfermagem - CAV
Processo nº 23076.014726/2013-74

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Modelo Experimental de Paralisia cerebral: Implicações da Desnutrição Perinatal Sobre a Atividade Locomotora e Metabolismo Protéico Muscular”**.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério de criação do Departamento de Nutrição/UFPE. Animais: ratos wistar; Peso: 220-250g; sexo: machos e fêmeas; idade: 29 dias; nº total de animais: 62 ratos.

Atenciosamente,

 Profª. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver