



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

HENRIQUE JOSÉ CAVALCANTI BEZERRA GOUVEIA

**SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA E TREINAMENTO RESISTIDO: ESTUDO
DOS EFEITOS NEUROMUSCULOESQUELÉTICOS EM UM MODELO DE
PARALISIA CEREBRAL EM RATOS**

Recife

2022

HENRIQUE JOSÉ CAVALCANTI BEZERRA GOUVEIA

**SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA E TREINAMENTO RESISTIDO: ESTUDO
DOS EFEITOS NEUROMUSCULOESQUELÉTICOS EM UM MODELO DE
PARALISIA CEREBRAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Nutrição, área de concentração Bases Experimentais da Nutrição.

Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientador: Prof^o. Dr. Raul Manhães de Castro.

Coorientadora: Prof^a. Dra. Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro.

Recife

2022

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

G719s Gouveia, Henrique José Cavalcanti Bezerra.
Suplementação com creatina e treinamento resistido : estudo dos efeitos neuromusculares em um modelo de paralisia cerebral em ratos / Henrique José Cavalcanti Bezerra Gouveia. – 2022.
108 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientador : Raul Manhães de Castro.
Coorientadora : Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2022.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Paralisia Cerebral. 2. Creatina. 3. Exercício Físico. 4. Hipertrofia. 5. Hipocampo. 6. Inflamação. I. Castro, Raul Manhães de (Orientador). II. Castro, Ana Elisa Toscano Meneses da Silva (Coorientadora). III. Título.

613.28 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2023-024)

HENRIQUE JOSÉ CAVALCANTI BEZERRA GOUVEIA

**SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA E TREINAMENTO RESISTIDO: ESTUDO
DOS EFEITOS NEUROMUSCULOESQUELÉTICOS EM UM MODELO DE
PARALISIA CEREBRAL EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Nutrição, área de concentração Bases Experimentais da Nutrição.

Aprovada em: 22/11/2022

Dra. Sandra Lopes de Souza

Dra. Raquel da Silva Aragão

Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

Dr. Diego Bulcão Visco

Dra. Matilde Cesiana da Silva

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, especialmente meus pais **Raul Otoni** e **Elilena Cavalcanti**, e minha irmã, **Rebeca Cavalcanti**, por todo o apoio incondicional.

Ao meu orientador, Professor **Raul Manhães de Castro**, por ter me dado a primeira oportunidade lá em 2016. Agradeço também pelas orientações e conselhos durante todo o período. À minha coorientadora, Professora **Ana Elisa Toscano**, pelas orientações e por sempre estar disposta a ajudar e realizar as missões mais impossíveis.

Aos membros da banca, por terem aceitado participar em cima da hora da minha defesa, **Prof^a Raquel da Silva**, **Prof^a Matilde Cesiana**, **Prof^o Diego Bulcão**, **Prof^a Florisbela de Arruda Camara**, **Prof^a Ângela Amâncio** e **Prof^o Diego Lacerda**. Agradeço especialmente a **Prof^a Sandra Lopes** que participou de todas as minhas qualificações e defesas do mestrado e doutorado.

Aos colaboradores do meu projeto, **Bárbara Santana**, **Carolina Mendonça**, **Sabrina Pereira**, **Eliesly Roberto**, **Ewerton Vasconcelos**, **Isla Ariadny** e **Profo Diogo Vasconcelos**. Agradeço especialmente aos colaboradores do México, **Pedro Romero Juárez**, **Mercedes Martínez**, **Dr. Omar Guzmán**, **Dra. Luz Torner** e **Dra. Angélica Roque**, que além de contribuírem com o meu projeto, me receberam de braços abertos. Ándale! À todos os outros professores do grupo de pesquisa: **Kelli Ferraz**, **Lígia Galindo**, **Isabeli Lins**, **Raquel Aragão**, **Diogo Vasconcelos**, **Giselia Muniz** e **Sandra Lopes**. Também agradeço aos professores da Pós-graduação em Nutrição.

Às minhas amigas, pela convivência e ajuda no dia a dia, **Carolina Cadete**, **Bárbara Santana** e **Carolina Mendonça**. Aos meus amigos do laboratório **Jakssuel**, **Vanessa**, **Eulália**, **Renata**, **Regina**, **Tássia**, **Lacerda**, **Márcia**, **Luan**, **Débora**, **Caio**, **Isla**, **Thaynan**, **Glacyele**, **Visco**, **Luana**, **Wenicios** e **Erika**, pelo companheirismo e pelas ajudas durante o processo.

À coordenação da Pós-graduação em Nutrição, em especial a **Cecília Arruda** e **Andréa Nascimento**, sempre dispostas a ajudar e resolver os problemas. Aos responsáveis pelo Biotério de criação do Departamento de Nutrição **Dr. França** e **Dr. Bruno**, pelos ensinamentos sobre os cuidados com os animais e pelos animais disponibilizados para a pesquisa.

À **Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de PE (FACEPE)** pelo apoio financeiro.

RESUMO

A paralisia cerebral (PC) compreende condições neurológicas caracterizadas por anormalidades no movimento, postura corporal e tônus muscular, sendo a atrofia e a fraqueza muscular duas das principais consequências. A Cr, assim como o exercício resistido, apresentam papel importante na síntese proteica/miogênese, inflamação e estresse oxidativo, assim, passaram a ser considerados para reabilitação de condições que apresentam alterações neuromusculares. Assim, no presente projeto, avaliamos os efeitos da Cr e do exercício resistido nas alterações neuromúsculoesqueléticas observadas em ratos submetidos à paralisia cerebral experimental. Foram utilizados 66 filhotes machos da linhagem Wistar (CEUA nº 0019/2019). Os filhotes foram submetidos a dois episódios de anóxia, no dia do nascimento (P0) e P1. Do P2 ao P28 foi realizada a restrição sensorio-motora durante 16 horas. A partir do dia 21 até o final do estudo foi realizada a suplementação com Cr (300mg/kg/dia), enquanto o programa de treinamento resistido foi realizado a partir do dia 29. Este programa de treino de resistência teve como plano 4-10 subidas por dia, 8-12 movimentos repetitivos por subida, 5 dias/semana (1 dia de descanso e 1 dia de teste de sobrecarga completando 7 dias), durante 4 semanas, com carga gradualmente acrescida. Os seguintes grupos foram formados após a introdução das duas intervenções (n=11): 1) Controle veículo; 2) Controle creatina; 3) PC veículo; 4) PC creatina; 5) Controle não treinado; 6) PC treinado. Em seguida, foram avaliados o peso corporal do P0 ao P60, consumo alimentar do P25 ao P60, força muscular no P30 e P60, parâmetros da locomoção no P30 e P60, densidade e porcentagem de ativação das células microgliais no P60, marcadores inflamatórios no hipocampo no P60, expressão de proteínas da via de síntese proteica e peso e massa magra de músculos das patas posteriores no P60. Observamos que a PC ocasionou reduções no peso corporal do P8 ao P60, no consumo alimentar do P25 ao P60, na força muscular no P30 e P60, e na área máxima de contato e intensidade de contato durante a marcha em CatWalk no P30 e P60 quando comparados aos animais controles. A PC ainda aumentou a densidade e ativação das células microgliais e a expressão da IL-6 no hipocampo e ocasionou redução significativa do peso dos músculos sóleo e EDL, do peso úmido e seco do músculo gastrocnêmio, do comprimento da tíbia e da expressão da proteína Akt total no músculo sóleo. A suplementação de Cr em animais PC, por sua vez, reduziu os prejuízos ao aumentar o peso corporal do P22 ao P50, a força

muscular no P30, área máxima de contato no P30 e intensidade de contato no P60 durante a marcha, e reduziu drasticamente a expressão de IL-6 no hipocampo. Com relação ao exercício resistido, por outro lado, houve redução do peso do músculo EDL e do comprimento da tíbia, o que indica um possível efeito negativo do exercício resistido nos animais com PC. Estes resultados demonstram que a suplementação de Cr pode ser usada como uma estratégia para reduzir os danos encontrados na PC, enquanto novos estudos precisam ser realizados com diferentes protocolos de treinamento resistido progressivo para determinar as melhores características, tendo em vista que estudos encontraram efeitos positivos com este tipo de treinamento para indivíduos que apresentam atrofia muscular.

Palavras-chave: paralisia cerebral; creatina; exercício físico; hipertrofia; hipocampo; inflamação.

ABSTRACT

Cerebral palsy (CP) comprises neurological conditions characterized by abnormalities in movement, body posture, and muscle tone, with atrophy and muscle weakness being two of the main consequences. Cr, as well as resistance exercise, play an important role in protein synthesis/myogenesis, inflammation, and oxidative stress, thus, have come to be considered for rehabilitation of conditions that present neuromuscular alterations. Thus, in the present project, we evaluated the effects of Cr and resistance exercise on neuromusculoskeletal changes observed in rats submitted to experimental cerebral palsy. Sixty-six male pups of the Wistar strain were used (CEUA nº 0019/2019). The pups were subjected to two episodes of anoxia, on the day of birth (P0) and P1. From P2 to P28, sensory-motor restriction was performed for 16 hours. From day 21 to the end of the study, supplementation with Cr (300mg/kg/day) was performed, while the resistance training program was carried out from day 29. This resistance training program had as plan 4-10 climbs per day, 8-12 repetitive movements per climb, 5 days/week (1 rest day and 1 overload test day completing 7 days), for 4 weeks, with gradually increasing load. The following groups were formed after the introduction of the two interventions (n=11): 1) water control; 2) creatine control; 3) water PC; 4) creatine PC; 5) untrained control; 6) trained PC. Then, body weight from P0 to P60, food consumption from P25 to P60, muscle strength at P30 and P60, locomotion parameters at P30 and P60, density and activation percentage of microglial cells at P60, inflammatory markers in the hippocampus at P60, protein expression of protein synthesis pathway and weight and lean mass of hind paw muscles at P60 were evaluated. We observed that CP caused reductions in body weight from P8 to P60, food intake from P25 to P60, muscle strength at P30 and P60, and maximum contact area and contact intensity during CatWalk walking at P30 and P60 when compared to control animals. CP also increased microglial cell density and activation and IL-6 expression in the hippocampus and caused significant reduction in soleus and EDL muscle weight, wet and dry weight of gastrocnemius muscle, tibia length and total Akt protein expression in soleus muscle. Cr supplementation in PC animals, in turn, reduced impairment by increasing body weight from P22 to P50, muscle strength at P30, maximum contact area at P30, and contact intensity at P60 during walking, and dramatically reduced IL-6 expression in the hippocampus. With respect to resistance exercise, on the other hand, there was a reduction in EDL muscle

weight and tibia length, indicating a possible negative effect of resistance exercise in animals with CP. These results demonstrate that Cr supplementation can be used as a strategy to reduce the damage found in CP, while new studies need to be conducted with different progressive resistance training protocols to determine the best characteristics, considering that studies have found positive effects with this type of training for individuals who present muscle atrophy.

Keywords: cerebral palsy; creatine; resistance training; hypertrophy; hippocampus; inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Vias de sinalização (simplificada) envolvidas no controle da atrofia e hipertrofia do músculo esquelético	29
Figura 2 -	Metabolismo intracelular da Cr	32
Figura 3 -	Desenho experimental nas diferentes fases do estudo	46
Figura 4 -	Efeitos da PC e Cr sobre o peso corporal no período pós-natal	53
Figura 5 -	Efeitos da PC e Cr no consumo alimentar no período pós-natal	54
Figura 6 -	Efeitos da PC e Cr sobre a força no período pós-natal	55
Figura 7 -	Efeitos da PC e Cr na área de contato e intensidade do contato com a plataforma CatWalk no período pós-natal	56
Figura 8 -	Efeitos da PC e Cr na densidade e alterações morfológicas das células microgliais no período pós-natal	58
Figura 9 -	Efeitos da PC e Cr na expressão de citocinas pró-inflamatórias no período pós-natal	59
Figura 10 -	Efeitos da PC e exercício resistido sobre o peso corporal no período pós-natal	60
Figura 11 -	Efeitos da PC e exercício resistido sobre o consumo alimentar no período pós-natal	61
Figura 12 -	Efeitos da PC e exercício resistido sobre a força muscular no período pós-natal	62
Figura 13 -	Efeitos da PC e exercício resistido sobre a área de contato e intensidade com a plataforma CatWalk no período pós-natal	63
Figura 14 -	Efeitos da PC e do exercício resistido na sinalização da via Akt-mTOR no músculo sóleo determinados por Western blotting	65
Figura 15 -	Efeitos da PC e do exercício resistido na sinalização da via Akt-mTOR no músculo EDL determinados por Western blotting	65
Figura 16 -	Ilustração esquemática dos principais resultados encontrados no experimento 1 (PC e Cr)	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências de primer usadas para análise de qPCR-RT do mRNA	49
Tabela 2 - Progressão de carga durante o exercício resistido durante as 4 semanas de treinamento	60
Tabela 3 - Peso e massa magra dos músculos das patas posteriores e comprimento da tíbia	64

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	PARALISIA CEREBRAL E MODELOS EXPERIMENTAIS	17
2.2	HIPOCAMPO: DESENVOLVIMENTO E ALTERAÇÕES	21
2.3	REGULAÇÃO DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA	24
2.4	CREATINA: METABOLISMO E APLICAÇÕES	30
2.5	EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO	37
3	HIPÓTESE	41
4	OBJETIVOS	42
4.1	OBJETIVO GERAL	42
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
5	MÉTODOS	43
5.1	ANIMAIS	43
5.2	ANÓXIA PERINATAL E RESTRIÇÃO SENSÓRIO-MOTORA	43
5.3	SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA	44
5.4	EXERCÍCIO DE RESISTÊNCIA	44
5.5	GRUPOS EXPERIMENTAIS	45
5.6	ANÁLISES EXPERIMENTAIS	46
5.6.1	Análises comuns para os experimentos 1 e 2	46
5.6.2	Análises exclusivas para o experimento 1 (PC e Cr)	47
5.6.3	Análises exclusivas para o experimento 2 (PC e exercício resistido)	49
6	RESULTADOS	52
6.1	EXPERIMENTO 1	52
6.2	EXPERIMENTO 2	59
7	DISCUSSÃO	67
7.1	PARALISIA CEREBRAL	68
7.2	CREATINA	70
7.3	EXERCÍCIO RESISTIDO	73

8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
	REFERÊNCIAS	77
	APÊNDICE A – Artigo de opinião publicado na revista Clinical Nutrition ESPEN	95
	ANEXO A – Comitê de ética	108

1 INTRODUÇÃO

A paralisia cerebral (PC) é um tipo de distúrbio que influencia o movimento, e em formas mais graves, a capacidade do indivíduo de realizar as mais simples atividades diárias por conta da alteração do tônus muscular (BAX et al., 2005). Na maioria dos casos, a anormalidade motora mais predominante é a espasticidade. De fato, dados epidemiológicos indicam que a PC espástica, caracterizada por aumento do tônus muscular e reflexos patológicos é o tipo mais comum, responsável por 80% dos casos (CLOWRY; BASUODAN; CHAN, 2014). A PC pode ocorrer durante o desenvolvimento cerebral nos períodos pré-natal, perinatal e pós-natal (KRIGGER, 2006). Vários são os fatores de riscos que podem levar à PC, como má nutrição, nascimento pré-termo, como o baixo peso ao nascer e asfixia (BAX; FLODMARK; TYDEMAN, 2007). As principais consequências patológicas observadas nos pacientes com PC, que variam de acordo com o tipo da PC estudada, são desordens de movimento, marcha em tesoura, espasticidade, atrofia, fraqueza e rigidez muscular (KRIGGER., 2006). Fadiga, dor e sintomas depressivos também são comuns em indivíduos com PC (MAESTRO-GONZALEZ et al., 2018). Em estudos em humanos e com modelos experimentais foi observado que a PC promove atrofia muscular associada à modificação no tamanho das fibras musculares (ITO et al., 1996; MARBINI et al., 2002; SILVA et al., 2016).

Tendo em vista que lesões difusas na matéria cinzenta e branca do cérebro são características comuns observadas atualmente na PC, diferentes áreas do cérebro vêm sendo estudadas e destacadas pelos seus inesperados papéis na progressão e tratamento da PC, como o hipocampo (COQ et al., 2020; WANG et al., 2021). O hipocampo está envolvido em funções cognitivas importantes como a memória, navegação espacial e aprendizagem, mas também é um importante regulador de respostas emocionais ao stress, pois é uma das estruturas do cérebro envolvidas no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (EICHENBAUM; COHEN, 2014; LAJUD; TORNER, 2015). O hipocampo é também um dos dois nichos onde os novos neurônios são ativamente produzidos ao longo da vida (LAJUD; TORNER, 2015). Assim, a ideia de que a neurogênese hipocampal acontece no adulto e tem importantes contribuições funcionais para a plasticidade neural e a cognição ao longo da vida humana é bem aceita atualmente, apesar de ainda haver questões pendentes (KEMPERMANN et al., 2018). Células que estão presentes nos nichos neurogênicos, como as células da glia, principalmente os astrócitos e as micróglias, estão

criticamente envolvidas no desenvolvimento das lesões (DENG, 2010; EKDAHL, 2012; MA; MING; SONG, 2005). Entretanto, até o momento não existem estudos publicados com modelos de PC com privação de oxigênio e restrição sensório-motora que tenham avaliado as alterações no fenótipo e densidade de micróglia. Por outro lado, diversas alterações na musculatura esquelética já foram bem descritas em diferentes modelos de PC, tornando necessário estudar como diferentes intervenções podem regular positivamente parâmetros associados à hipertrofia miofibrilar.

Todas as proteínas do nosso corpo estão em constante estado de *turnover* (síntese e degradação). Nos seres humanos adultos, nos quais o crescimento cessou, os processos de síntese e degradação são iguais e opostos diariamente (PHILLIPS; GLOVER; RENNIE, 2009). Entretanto, alterações no equilíbrio proteico ocorrem diariamente sob influências ambientais, como a nutrição e atividade física (PHILLIPS; GLOVER; RENNIE, 2009; ATHERTON; SMITH, 2012). No caso da PC, as atenções se voltam para a inatividade física, ou desuso muscular. O desuso da musculatura esquelética resulta em redução da massa muscular por ocasionar, principalmente, redução da síntese proteica muscular (SPM) (GLOVER et al., 2008; PHILLIPS; GLOVER; RENNIE, 2009). O músculo esquelético, além de ser considerado o órgão da locomoção, é um grande contribuidor do gasto energético e o maior reservatório para o armazenamento de glicose pós-prandial estimulado pela insulina (THIEBAUD et al., 1982; ZURLO et al., 1990). Assim, mesmo curtos períodos de inatividade física e consequentemente inatividade muscular estão associados com alterações metabólicas, incluindo aumento da resistência à insulina e atrofia muscular (KROGH-MADSEN et al., 2010). Assim, a presença de fraqueza muscular e redução da massa muscular sugerem que os portadores de PC podem se beneficiar de intervenções que visem o aumento de força e/ou massa muscular. Dentre elas, destacamos a creatina e o exercício resistido.

A creatina (Cr) é uma amina nitrogenada encontrada principalmente na musculatura esquelética (95%) frequentemente utilizada como suplemento nutricional por atletas em esportes anaeróbicos, ou seja, com predominância do metabolismo glicolítico (HALL; TROJIAN, 2013). Dentro das células, a Cr na sua forma fosforilada (PCr) possui um importante papel no sistema energético fosfogênio adenosina trifosfato (ATP)/fosfocreatina (PCr), fornecendo fosfato para a ressíntese do ATP (WALLIMANN et al., 1992). Por causa da descoberta dos mecanismos subjacentes ao efeito anabólico e neuroprotetor, a Cr passou a ser considerada para ações de

promoção, proteção, prevenção, recuperação e reabilitação (DOLAN; GUALANO; RAWSON, 2019). O corpo de evidências sugere que a Cr pode exercer seus efeitos direta ou indiretamente através de múltiplos mecanismos, com impactos convergentes na síntese proteica/miogênese, inflamação e estresse oxidativo (DELDICQUE et al., 2007; BASSIT; CURI; COSTA ROSA, 2008; GUIMARÃES-FERREIRA et al., 2012), além de neuroproteção (BENDER et al., 2005; GENIUS et al., 2012; LAWLER et al., 2002; O’GORMAN et al., 1997; TRAN et al., 2021).

Diversos estudos apresentaram o exercício físico como uma estratégia para diminuir o risco de doenças cardiovasculares, pulmonares, imunológicas, metabólicas e neurodegenerativas (HAMER; CHIDA, 2008; LANCASTER; FEBBRAIO, 2014; MANTOANI et al., 2017; NYSTORIAK; BHATNAGAR, 2018; PEDERSEN; ROHDE; OSTROWSKI, 1998). O exercício por si é um potente estímulo para a remodelação e recondição do músculo esquelético (EGAN; ZIERATH, 2013). É amplamente aceito que o exercício físico feito de forma regular promove efeitos sinérgicos em diferentes órgãos e tecidos, especialmente entre músculos e cérebro, músculos e pulmões, e músculos e coração (PINHO; AGUIAR; RADÁK, 2019). Ao utilizar treinamento resistido em escada por 4 semanas, Gomes et al. (2014) relataram efeitos benéficos no giro denteado do hipocampo (NOVAES GOMES et al., 2014). Son et al. (2016) aplicaram um modelo de imobilização dos membros posteriores em ratos Sprague-Dawley que em seguida realizaram treinamento resistido em escada (SON et al., 2016). Os pesquisadores avaliaram a capacidade do treinamento em reduzir os níveis da proteína osteonectina (Secreted protein acidic and rich in cystein – SPARC), com atrofia miofibrilar, e relataram redução da mesma no músculo plantar (SON et al., 2016). Os autores também relataram aumento de força e menor redução da área seccional transversal nas células dos músculos imobilizados (SON et al., 2016). Assim, no presente projeto, pretende-se explorar essa perspectiva da ação da Cr e do exercício resistido nas alterações neuromusculoesqueléticas em modelo de PC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PARALISIA CEREBRAL E MODELOS EXPERIMENTAIS

Nos mamíferos, há períodos do desenvolvimento dos sistemas fisiológicos que são muito mais vulneráveis aos insultos ambientais, físicos, químicos e biológicos (RICE; BARONE, 2000). Esses períodos são dependentes de processos celulares críticos, tais como, proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose no que diz respeito ao desenvolvimento neural (RICE; BARONE, 2000), e diferenciação, proliferação e migração no tocante ao desenvolvimento muscular (SAMBASIVAN; TAJBAKSHI, 2007). Pesquisas no campo da plasticidade neural e muscular têm destacado a influência que as alterações ambientais podem exercer sobre a atividade destes sistemas em indivíduos durante a fase precoce do desenvolvimento e suas repercussões em longo prazo (GLORE; LAYMAN, 1983; JONES; DYSON, 1981). Desta forma, transtornos neurológicos que apresentam alterações musculares podem ser resultantes de uma agressão ambiental ocorrida durante o desenvolvimento cerebral (BAX et al., 2005), como é o caso da PC (BAX et al., 2005; YEARGIN-ALLSOPP et al., 2008).

A PC compreende condições neurológicas caracterizadas por anormalidades no movimento, postura corporal e tônus muscular, o que ocasiona limitações na atividade de vida diária e dependência funcional (BAX et al., 2005). Trata-se de uma condição estática, não progressiva, conseqüente à agressão ocorrida durante o desenvolvimento cerebral nos períodos pré-natal, perinatal e pós-natal, até o segundo ano de vida (KRIGGER, 2006). Esta condição acomete aproximadamente duas a cada mil crianças em países desenvolvidos, sendo a causa mais comum de incapacidade motora crônica na infância (MCINTYRE et al., 2022). Contudo, vale ressaltar que em países em desenvolvimento a incidência é maior (3,4 a cada 1000 nascidos), pois esses países reúnem condições mais favoráveis à ocorrência de problemas crônicos como a PC (MCINTYRE et al., 2022). No Brasil, apesar de não existir um dado preciso sobre a prevalência, estima-se que a cada 1.000 crianças nascidas vivas, sete são portadoras de PC (LIMA; FONSECA, 2004), e cerca de 30.000 a 40.000 novos casos ocorrem por ano (MANCINI et al., 2002).

Dos anos 60 até 2010, a prevalência da PC flutuou ao redor de 2,1%, embora relatos comuns de diminuição nos últimos anos na Europa, Japão e Austrália (GALEA et al., 2019; SELLIER et al., 2016). As sequelas da PC também se alteraram nas

últimas décadas. Antes dos anos 90, as sequelas incluíam lesões císticas no cérebro associados a graves alterações sensoriomotoras e deficiências comportamentais/cognitivas, enquanto após esse período o quadro evoluiu gradualmente para lesões difusas na matéria cinzenta e branca do cérebro (COQ et al., 2020). Essas alterações foram principalmente associadas com perturbações sensorimotoras moderadas a severas e déficits comportamentais/cognitivos como dificuldades de aprendizagem, distúrbios de atenção e hiperatividade (COQ et al., 2020). Essas mudanças surgiram em relação ao aumento população de sobreviventes de nascimento de baixo peso e prematuridade, e correspondem à encefalopatia da prematuridade associada à inflamação da placenta como a causa do parto prematuro espontâneo, um fator de risco para a PC (GALEA et al., 2019; GRAHAM et al., 2016; JANTZIE; ROBINSON, 2015; VOLPE, 2009).

A classificação e a complexidade da condição podem ser influenciadas por diversos fatores, sendo eles: local anatômico do cérebro onde houve a lesão (córtex cerebral, trato piramidal, sistema extrapiramidal ou cerebelo); quadro clínico (espástica, discinética ou atáxica); envolvimento das extremidades (diplégica, quadriplégica ou hemiplégica); momento do insulto (pré-parto, intraparto ou pós-natal); e nível do tônus muscular (isotônico, hipotônico ou hipertônico) (RETHLEFSEN; RYAN; KAY, 2010; SANGER et al., 2003). Tendo em vista a complexidade da condição, classificações mais padronizadas foram propostas para facilitar o desenvolvimento de pesquisas, a transferência de conhecimentos e a utilização nos registros médicos (COLVER; FAIRHURST; PHAROAH, 2014). Essa classificação se baseia no quadro clínico e envolvimento das extremidades, ou seja, espástica, discinética ou atáxica e diplégica, quadriplégica ou hemiplégica, respectivamente (COLVER; FAIRHURST; PHAROAH, 2014). Todos os tipos classificados de acordo com o quadro clínico são caracterizados por padrão anormal de postura e/ou movimento, mas diferem umas das outras com relação ao tônus muscular, reflexos patológicos e coordenação motora (CANS, 2000). Dados epidemiológicos indicam que a PC espástica, caracterizada por aumento do tônus muscular e reflexos patológicos (hiperreflexia e/ou sinais piramidais) é o tipo mais comum, responsável por 80% dos casos (CLOWRY; BASUODAN; CHAN, 2014).

Vários são os fatores de riscos que podem levar à PC, como má nutrição, nascimento pré-termo (< 32semanas), baixo peso ao nascer (< 2500g), malformações, traumas, infecções maternas, asfixia, quedas, dentre outros (BAX; FLODMARK;

TYDEMAN, 2007). As causas são múltiplas e podem agir de forma sinérgica, como sugere a hipótese dos “múltiplos golpes” (RUMAJOGEE et al., 2016). As principais consequências patológicas observadas nos pacientes com PC, dependendo do tipo, são desordens de movimento, marcha em tesoura, ataxia, espasticidade, persistência de reflexos primitivos, atrofia, fraqueza e rigidez muscular (KRIGGER, 2006). Os portadores da PC ainda podem apresentar prejuízos cognitivos, distúrbios da fala e da linguagem, problemas de crescimento ou dor (COLVER; FAIRHURST; PHAROAH, 2014), modificação no tamanho das fibras musculares e alteração de seus fenótipos (ITO et al., 1996; MARBINI et al., 2002), além de distúrbios orofaciais (KRICK; DUYN, 1984). Por fim, estudos relataram mudanças em marcadores inflamatórios em indivíduos com PC, incluindo alterações na proteína C reativa (CRP), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MAGALHÃES et al., 2019; PINGEL et al., 2019). Assim, a PC é uma condição abrangente que envolve diversas condições etiológicas e uma série de distúrbios que limitam a dependência funcional (CLOWRY; BASUODAN; CHAN, 2014).

Na tentativa de desenvolver estratégias terapêuticas eficazes para os diferentes tipos da PC, modelos experimentais, principalmente induzidos por asfixia perinatal, foram elaborados com o objetivo de reproduzir injúrias morfológicas observadas nos humanos (BLOMGREN; HAGBERG, 2006; HOEGER et al., 2000; LUBICS et al., 2005; OLIVIER et al., 2005; ROBINSON et al., 2005). A asfixia perinatal e a encefalopatia hipóxico-isquêmica são duas das causas mais comuns de PC (ZHANG et al., 2020). Dentre as consequências da asfixia perinatal, destacam-se, além da lesão neurológica, dificuldade respiratória, hipertensão pulmonar, disfunção hepática, miocárdica e renal (POPESCU et al., 2020). Em estudo realizado com ratos expostos à anóxia, Dell’Anna et al. (1991) relatou desenvolvimento de uma síndrome caracterizada por hiperatividade transitória jovem, e prejuízo na memória espacial em longo prazo associada à redução na densidade celular hipocampal CA1 na idade adulta (DELL’ANNA et al., 1991).

De fato, dentre as áreas do cérebro, o hipocampo é particularmente susceptível ao estresse (KIM; PELLMAN; KIM, 2015). Em um modelo de PC induzido por lipopolissacarídeo (LPS) combinado com hipóxia/ischemia, Wang et al. (2021) relataram alterações significantes nos proteomas do hipocampo e córtex motor, além de prejuízos no sistema motor (WANG et al., 2021). Entretanto, no contexto da PC, diversos estudos relataram que apesar de reproduzirem danos semelhantes como

injúrias na matéria branca ao redor dos ventrículos, a restrição de oxigênio ocasiona apenas alterações motoras leves (HOEGGER et al., 2000; LUBICS et al., 2005; ROBINSON et al., 2005). Por outro lado, modelos experimentais induzidos por desuso (restrição sensório-motora) obtiveram mais sucesso em ocasionar prejuízos na função motora (CANU; FALEMPIN, 1998; COQ et al., 2008; STRATA et al., 2004).

Strata et al. (2004) relataram efeitos duradouros como redução do peso corporal, aumento do tônus muscular, padrões anormais de locomoção e desorganização no córtex motor (STRATA et al., 2004). Posteriormente, Coq et al. (2008) demonstraram que este comportamento motor estava associado à atrofia das fibras musculares, degeneração articular e do joelho, além de representação distorcida dos membros inferiores no córtex somatossensorial primário. A asfixia perinatal, por sua vez, causou apenas alterações leves sobre o tônus muscular, desempenho motor e organização cortical (COQ et al., 2008). Delcour et al. (2018b) relataram marcha e postura severamente prejudicadas associada à hiperextensão do joelho-tornozelo. Os autores também relataram redução do comprimento e densidade do osso tibial, degeneração da articulação do joelho, atrofia do gastrocnêmio e hiperreflexia muscular sugerindo espasticidade (DELCOUR et al., 2018a). Em recente revisão avaliando modelos experimentais, Lacerda et al. (2017) demonstraram que os distúrbios orofaciais são encontrados em todos os modelos experimentais, em diferentes espécies, de PC, o que pode ocasionar deficiências nutricionais (LACERDA et al., 2017a). Além disso, deficiências nutricionais também podem ser ocasionadas em modelos experimentais pelos distúrbios da marcha (LACERDA et al., 2017b; SILVA et al., 2016). Ainda, em estudo experimental foi observado que a PC promove atrofia muscular associada à diminuição da atividade locomotora, modificação no tamanho das fibras musculares e alteração de seus fenótipos (SILVA et al., 2016).

Em um estudo recente, Visco et al. (2022) observaram redução do peso do músculo sóleo e diminuição da quantidade de fibras do tipo I associado a um consequente aumento no número de fibras do tipo II (VISCO et al., 2022). Os autores relataram redução da área de ambos os tipos de fibras, além de redução da expressão da proteína Akt fosforilada e total (VISCO et al., 2022). Em outro estudo com o mesmo modelo, os ratos com CP apresentaram redução da atividade locomotora, da coordenação motora e da força muscular, possivelmente associados à redução do peso do sóleo e EDL, menor área das fibras musculares e menor peso da tíbia (PEREIRA et al., 2021). Houve ainda alteração nos níveis de expressão de vários

genes relacionados ao desenvolvimento muscular e junções neuromusculares como por exemplo aumento dos níveis de mRNA de *Igfbp5*, *Kcnn3*, *Gdf8* e *MyH4* e diminuição da expressão de *Myog*, *Ucp2* e *Lpl* (PEREIRA et al., 2021).

Recente revisão sistemática com meta-análise relatou que a combinação de modelos de lesões cerebrais perinatais, independentemente do período de insultos, aumenta os danos na locomoção e coordenação motora a curto e longo prazo, especialmente quando a restrição sensorimotora é realizada (PEREIRA et al., 2021). Além disso, o modelo isolado de anóxia não ocasionou repercussões motoras significativas mesmo em curto prazo, o que corrobora os estudos anteriormente citados (PEREIRA et al., 2021). Assim, a associação de asfixia perinatal e desuso muscular por restrição sensório-motora pode ser considerado um modelo simples, eficaz e reproduzível de um fenótipo motor semelhante aos portadores humanos de PC. A utilização destes modelos experimentais possibilita o estudo das alterações centrais e periféricas, além de tornar possível avaliar intervenções visando a redução dos danos ocasionados pelos diferentes estressores.

Utilizando estes modelos, estudos observaram aumento da maturação mastigatória devido ao provável aumento da expressão de serotonina causada pela suplementação de triptofano e restauração da disfunção musculoesquelética e locomotora após a intervenção com o fator de crescimento 19 do Fibroblastos (LACERDA et al., 2019; PEREIRA et al., 2021). Após suplementação de Kaempferol, um flavonoide com propriedade anti-inflamatória e neuroprotetora, observamos redução no impacto da PC no fenótipo corporal, na força muscular, na marcha e na proporção de fibras oxidativas no músculo sóleo (VISCO et al., 2022). Assim, acreditamos que é apropriado continuar testando intervenções em modelos experimentais destinadas a reduzir os danos observados, com o objetivo de encontrar alternativas de tratamento para os indivíduos portadores de PC. Tendo em vista que lesões difusas na matéria cinzenta e branca do cérebro são características comuns observadas atualmente na PC, diferentes áreas do cérebro vêm sendo estudadas e destacadas pelos seus inesperados papéis na progressão e tratamento da PC, como o hipocampo (COQ et al., 2020; WANG et al., 2021).

2.2 HIPOCAMPO: DESENVOLVIMENTO E ALTERAÇÕES

O hipocampo é uma extensão do lobo temporal do córtex cerebral e pode ser distinguido externamente como uma camada densa de neurônios que se entrelaçam numa estrutura em forma de S na borda do lóbulo temporal (GILBERT; BRUSHFIELD, 2009). Quatro estruturas são descritas durante a formação hipocampal: Cornu ammonis (CA), o qual se divide em CA1, CA2, CA3, and CA4, giro dentado (DG), subiculum, e área entorrinal (EC) (ANAND; DHIKAV, 2012). O hipocampo está envolvido em funções cognitivas importantes como a memória, navegação espacial e aprendizagem, mas também é um importante regulador de respostas emocionais ao stress, pois é uma das estruturas do cérebro envolvidas no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (EICHENBAUM; COHEN, 2014; LAJUD; TORNER, 2015). O hipocampo é também um dos dois nichos onde os novos neurônios são ativamente produzidos ao longo da vida (LAJUD; TORNER, 2015). De fato, Altman e Das (1965) observaram neurogênese no hipocampo em ratos adultos já nos anos 60 (ALTMAN; DAS, 1965). No entanto, só nos anos 90 o conceito de neurogênese funcional hipocampal começou a surgir (PALMER; RAY; GAGE, 1995; PALMER; TAKAHASHI; GAGE, 1997). A neurogênese é caracterizada pela geração de novos neurônios a partir células-tronco neurais ou células neurais progenitoras (RAMASAMY et al., 2013). Assim, a ideia de que a neurogênese hipocampal acontece no adulto e tem importantes contribuições funcionais para a plasticidade neural e a cognição ao longo da vida humana é bem aceita atualmente, apesar de ainda haver questões pendentes (KEMPERMANN et al., 2018).

O hipocampo desenvolve-se perinatalmente tanto em roedores como humanos (SEMPLE et al., 2013). No entanto, o desenvolvimento volumétrico persiste até o P21 em roedores e até 2 anos de vida em humanos (AINGE; LANGSTON, 2012; HEVNER, 2016). Enquanto a maioria das células piramidais hipocampais são geradas prenatalmente, apenas cerca de 15% das células granulares estão presentes no giro dentado do rato após o nascimento, com o pico de neurogênese acontecendo entre os dias 14 e 17 pós-natais (DIAMOND, 1990; RICE; BARONE, 2000). Já nos humanos, a neurogênese hipocampal atinge o pico ao redor do dia 60 de vida e cerca de 80% das células granulares do giro dentado são geradas antes do nascimento (CLANCY et al., 2007; RAKIC; NOWAKOWSKI, 1981). Duas áreas são consideradas as principais responsáveis pela neurogênese no cérebro humano adulto: zona subgranular (SGZ) do giro dentado do hipocampo e zona subventricular (SVZ) dos

ventrículos laterais, que apresentam microambientes (nichos) especializados em regular as células-tronco (ERIKSSON et al., 1998).

Tendo em vista o importante desenvolvimento pós-natal em humanos e animais, a exposição precoce a experiências adversas é capaz de induzir mudanças permanentes no desenvolvimento do cérebro, incluindo alterações na formação hipocampal e alteração da plasticidade neural (LAJUD; TORNER, 2015; SEMPLE et al., 2013). Prejuízos na neurogênese hipocampal já foram observados em condições neurodegenerativas e psiquiátricas, e têm sido tema de interesse no contexto da PC (BALU; LUCKI, 2009; VISCO et al., 2021). Na PC experimental induzida após injeção de lipopolissacarídeo (LPS), o número de células BrdU-positivas, um marcador de neurogênese, foi reduzido, e o número de células TUNEL-positivas, um marcador de apoptose, foi aumentado no hipocampo (CHO et al., 2018). Em outro estudo, a exposição de ratos recém-nascidos à anóxia ocasionou redução na densidade celular hipocampal CA1 na idade adulta (DELL'ANNA et al., 1991). Em um estudo proteômico, Wang et al. (2021) observaram, por exemplo, que a periferina, uma proteína que desempenha papel na regeneração axonal após injúrias, estava aumentada no hipocampo de animais com PC, indicando dano na área (WANG et al., 2021). De fato, sabe-se que os recém-nascidos prematuros apresentam uma maior propensão a lesões cerebrais causadas por eventos hipóxicos ou isquêmicos, infecção e/ou inflamação que resulta em lesão proeminente no cérebro (DENG, 2010). Ademais, células que estão presentes nos nichos neurogênicos, como as células da glia, principalmente os astrócitos e as micróglias, estão criticamente envolvidas no desenvolvimento das lesões (DENG, 2010; EKDAHL, 2012; MA; MING; SONG, 2005).

As células microgлияis, células imunes inatas do SNC localizadas em nichos neurogênicos, são consideradas importantes para a neurogênese e funções normais do cérebro, tais como resposta a insultos, que podem ocorrer ineficientemente após a ativação excessiva destas células (EKDAHL, 2012). Isso acontece devido à liberação de neurotrofinas, fatores de crescimento e citocinas, além de realização de apoptose de células via fagocitose (DEVERMAN; PATTERSON, 2009; KOZAREVA; CRYAN; NOLAN, 2019; NAYAK; ROTH; MCGAVERN, 2014). As citocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β e TNF- α são consideradas importantes mediadores da neurogênese e são agudamente liberadas pelas micróglias ativadas (IOSIF et al., 2006; YIRMIYA; GOSHEN, 2011). As micróglias ativadas são denominadas de amebóides, enquanto as inativas são chamadas de ramificadas (DIZ-CHAVES et al., 2012).

Durante o desenvolvimento pós-natal, diversos fatores podem afetar o fenótipo, mas também a densidade das micróglias. A administração sistêmica repetida de IL-1 β em ratos entre o P1 e P5 resultou em aumento transitório da densidade microglial e redução na mielinização em longo prazo que foram acompanhados por déficits cognitivos (FAVRAIS et al., 2011). Estudos encontraram alterações no fenótipo de células gliais no hilo hipocampal e CA3 após diferentes estressores durante o período neonatal, incluindo a separação materna (ROQUE; OCHOA-ZARZOSA; TORNER, 2016; SAAVEDRA et al., 2021). A administração de lipopolissacarídeo (LPS) no P5 também ocasionou aumento transitório do número absoluto e da densidade celular da microglia, bem como alteração persistente do estado inflamatório hipocampal (SMITH et al., 2014).

Outros estudos encontraram mudanças nos níveis de mRNA de *Il-6*, *Tnf- α* e *Il-1 β* no hipocampo após estresse induzido pela exposição à luz brilhante durante a gestação e/ou separação maternal (DIZ-CHAVES et al., 2012; ROQUE; OCHOA-ZARZOSA; TORNER, 2016). Por outro lado, a ativação microglial induzida por LPS e consequente diminuição significativa na sobrevivência dos neurônios recém-formados no hipocampo foi reduzida após o uso de um agente anti-inflamatório (MONJE; TODA; PALMER, 2003). Apesar de haver estudos com LPS, um dos indutores de PC, não existem estudos até o momento com modelos de PC com privação de oxigênio e restrição sensorio-motora que tenham avaliado as alterações no fenótipo e densidade de micróglias. Por outro lado, apesar de diversas alterações na musculatura esquelética já terem sido observadas em diferentes modelos de PC, torna-se necessário continuar estudando como diferentes intervenções podem regular positivamente parâmetros associados à hipertrofia miofibrilar.

2.3 REGULAÇÃO DA MUSCULATURA ESQUELÉTICA

O músculo esquelético é o maior órgão humano compreendendo até 50% do peso do corpo (BÖRSCH et al., 2021). O mesmo é composto de células musculares esqueléticas longas, cilíndricas e multinucleadas denominadas fibras musculares. Os músculos do corpo humano, e na maioria dos mamíferos, são compostos por diferentes tipos de fibras (HOWARD; HERZOG, 2021). As fibras contêm milhares de miofibrilas que se encontram em paralelo entre si, e podem ser divididas no nível mais básico em fibras lentas (tipo I) ou rápidas (tipo II), dependendo se usam

predominantemente respiração aeróbica (fosforilação oxidativa) ou metabolismo anaeróbico (glicólise) (HOWARD; HERZOG, 2021; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011). As fibras de contração rápida são tipicamente subdivididas em fibras de tipo 2A, 2B, e 2X com base em sua expressão gênica de cadeia pesada de miosina, entretanto, as fibras do tipo 2A são metabolicamente mais semelhantes às do tipo 1, ou seja, dependem principalmente do metabolismo oxidativo (HOWARD; HERZOG, 2021). As fibras de contração lenta têm como característica funcional lento aumento de força e relaxamento, e velocidade lenta de descarga máxima de contração em relação às fibras de contração rápida. Assim, a força gerada durante o encurtamento das fibras é muito maior nas fibras rápidas, resultando em uma potência máxima três a quatro vezes maior. Por outro lado, por gerar menos força e depender mais do metabolismo oxidativo, as fibras lentas são mais resistentes à fadiga, permitindo um trabalho submáximo por um período mais longo (HOWARD; HERZOG, 2021).

O crescimento muscular é determinado aumento no número de fibras musculares (hiperplasia), bem como aumento no tamanho/área da seção transversal das fibras musculares (hipertrofia) (YANG, 2014). Em humanos, o número de fibras musculares é determinado antes do nascimento, entretanto, evidências sugerem que em roedores a hiperplasia pode ocorrer após o nascimento (ENESCO; PUDDY, 1964; SUMMERS; MEDRANO, 1994). Entretanto, o crescimento muscular pós-natal resulta principalmente da hipertrofia muscular através do aumento do comprimento e circunferência da fibra muscular, com participação importante das células satélites, que se fundem às fibras musculares adjacentes para aumentar seus tamanhos (YANG, 2014). Mudanças importantes no perfil do tipo de fibra também ocorrem durante os estágios iniciais de desenvolvimento pós-natal. Por exemplo, em ratos há uma transformação progressiva de fibras do tipo 2A em fibras do tipo 1 no músculo sóleo, um processo que continua durante todo o desenvolvimento pós-natal (KUGELBERG, 1976). Há também alterações nos músculos tibial anterior e plantar, que ao nascer contêm fibras do tipo 1 que desaparecem completamente ou quase completamente durante o desenvolvimento pós-natal (AGBULUT et al., 2003; WHALEN et al., 1984). Tendo em vista que as mudanças pós-natais no perfil do tipo de fibra podem ser explicadas pela ação combinada de um programa genético intrínseco e de fatores extrínsecos, tais como influência hormonal e neural (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2011), avaliar as alterações em fibras em diferentes condições torna-se essencial.

Além de ser considerado o órgão da locomoção, o músculo esquelético é um grande contribuidor do gasto energético e o maior reservatório para o armazenamento de glicose pós-prandial estimulado pela insulina e de aminoácidos (THIEBAUD et al., 1982; WOLFE, 2006; ZURLO et al., 1990). Assim, mesmo curtos períodos de inatividade física e conseqüentemente inatividade muscular estão associados com alterações metabólicas, incluindo aumento da resistência à insulina, redução da aptidão cardiorrespiratória e atrofia muscular (KROGH-MADSEN et al., 2010). Diversos estudos demonstraram nas últimas décadas que as anormalidades metabólicas ocasionadas pela redução da massa muscular estão associadas com aumento do risco do desenvolvimento e progressão de doenças crônicas e de morte prematura (BOOTH et al., 2002; MCLEOD; STOKES; PHILLIPS, 2019; MONNINKHOF et al., 2007; NOCON et al., 2008; TUOMILEHTO et al., 2001). Por outro lado, a musculatura esquelética, quando preservada e estimulada a partir da prática de exercícios físicos, pode mediar alguns dos mecanismos de proteção bem estabelecidos associados ao exercício através da secreção de proteínas denominadas miocinas (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012). Surge, assim, a ideia da musculatura esquelética como um órgão secretor, um órgão endócrino produtor e liberador de fatores humorais (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012). Portanto, são extremamente relevantes para a saúde humana estratégias que visem manter, aumentar ou recuperar a massa muscular esquelética perdida devido, por exemplo, ao desuso muscular. Para isso, torna-se necessário entender os processos responsáveis pelo turnover proteico na musculatura esquelética.

A musculatura esquelética apresenta-se como o maior reservatório de aminoácidos e proteínas no corpo (BONALDO; SANDRI, 2013). Esse reservatório, assim como todas as outras proteínas encontradas no corpo, está em constante *turnover* proteico, isto é, em permanente síntese e degradação (PHILLIPS; GLOVER; RENNIE, 2009). As proteínas são continuamente remodeladas através de flutuações nos processos de síntese proteica muscular (SPM) e degradação proteica muscular (DPM) (PHILLIPS; GLOVER; RENNIE, 2009). Os processos de SPM e DPM são influenciados pelo envelhecimento, pelo desuso muscular, por doenças metabólicas crônicas, pelo exercício físico e pela nutrição (BIOLO et al., 1997; GLYNN et al., 2010; GORISSEN; RÉMOND; VAN LOON, 2015; PHILLIPS, 2004). Além disso, variáveis endógenas, nomeadamente epigenéticas, transcriptômicas e proteômicas, que podem ser afetadas por variáveis exógenas (nutrição e exercício), também

influenciam estes processos (JOANISSE et al., 2020; TURNER; SEABORNE; SHARPLES, 2019). Dentre os dois, o de SPM é considerado o mais sensível. Assim, a perda de massa muscular em estados não patológicos está principalmente relacionada a reduções na SPM, tornando a proteólise (DPM) dominante, mas não elevada (PHILLIPS; GLOVER; RENNIE, 2009). O resultado desse processo é responsável pela perda, manutenção ou ganho de massa muscular esquelética (BURD et al., 2009; MITCHELL et al., 2015; PHILLIPS, 2004). De fato, a síntese proteica é regulada negativa e positivamente em condições não patológicas como um resultado do desuso não complicado e do consumo adequado de nutrientes associado à prática de exercício físico, respectivamente (PHILLIPS; GLOVER; RENNIE, 2009). À nível molecular, o exercício resistido e o consumo de nutrientes aumentam a SPM através de mecanismos dependentes e independentes do complexo 1 da proteína alvo mecanístico da rapamicina, ou simplesmente mTORC1 (HODSON et al., 2019; YOU et al., 2019).

Um complexo proteico central na transdução de sinais, o alvo mamífero do complexo 1 de rapamicina (mTORC1) é uma proteína-quinase treonina/serina indispensável para a sobrevivência celular, proliferação celular e síntese de novas proteínas musculares (MCGLORY; PHILLIPS, 2015). Este complexo é composto por uma subunidade catalítica alvo da rapamicina (mTOR) associada a outras proteínas adaptadoras, sendo elas: proteína regulatória de mTOR (RAPTOR), proteína 8 Sec13 mamífero letal (mLST8), proteína de interação mTOR contendo domínio DEP (DEPTOR) e o substrato de Akt rico em prolina, de 40 kDa (PRAS40) (FOSTER; FINGAR, 2010). De forma característica, a fosforilação do complexo mTORC1 a partir da sinalização de nutrientes (bioquímica) ou exercícios (biomecânica) ativa/inativa diversas proteínas quinases *downstream* e conseqüentemente aumenta a eficiência e a capacidade da tradução (HODSON et al., 2019; MCGLORY; DEVRIES; PHILLIPS, 2017). Para o aumento da eficiência há aumento na taxa de tradução do RNAm por uma quantidade constante de ribossomos, já para a elevação da capacidade há aumento no número total de ribossomos (HODSON et al., 2019; MCGLORY; DEVRIES; PHILLIPS, 2017). Pode-se dizer, então, que o complexo mTORC1 atua como um centro de controle que integra sinais sobre o estresse energético (via 5' Proteína quinase ativada por AMP [AMPK]), níveis de hormônios (insulina e IGF-1 via receptores de insulina [IRS] e fosfatidilinositol 3-quinases [PI3K]), estresse mecânico (vias sensório-mecânicas) e disponibilidade de nutrientes (principalmente

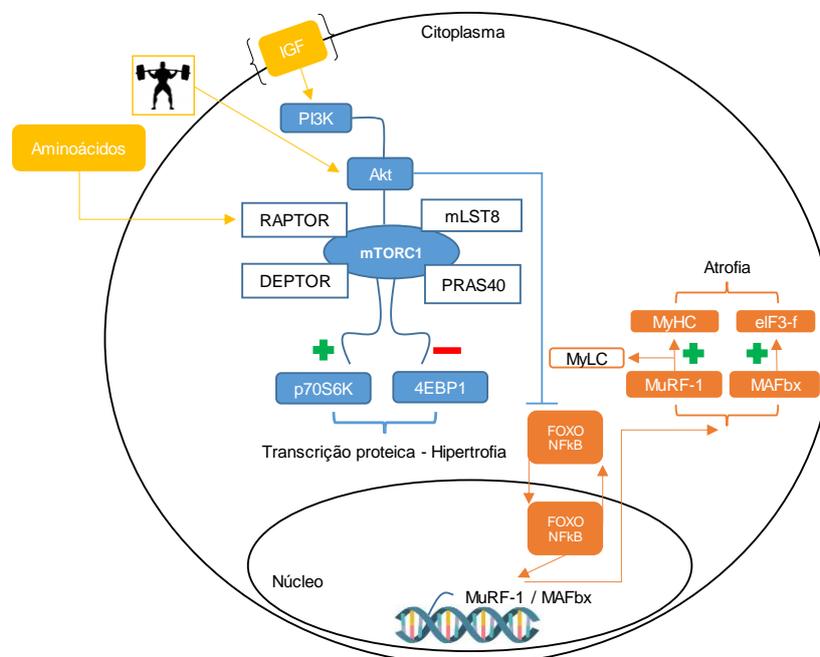
aminoácidos) (MCGLORY; PHILLIPS, 2015). Estas informações são integradas e retransmitidas para proteínas que conseqüentemente controlam a SPM (MCGLORY; PHILLIPS, 2015). As principais proteínas alvo do complexo mTORC1 são: proteína ribossômica S6 quinase 1 de 70 kDa (P70S6K1) e proteína de ligação ao fator de iniciação eucariótico 4E (4EBP1) (HERSHEY, 1991). A iniciação da tradução proteica é o resultado da fosforilação e estimulação da atividade da P70S6K1 e da fosforilação e inibição da atividade da 4EBP1 pelo complexo mTORC1 (GINGRAS et al., 1999; WANG et al., 2001). De forma contra regulatória, outros mecanismos estão relacionados com a inibição do complexo mTORC1 e estímulo da degradação proteica muscular.

Por sua vez, a DPM é regulada por diversos processos, incluindo os complexos de calpaína dependente de cálcio, calpaína lisossomal e caspases e a via ubiquitina-proteassoma (BARTOLI; RICHARD, 2005; BODINE; BAEHR, 2014; GLOVER et al., 2010). Estudos observaram que durante o desuso há um aumento da expressão de RNA mensageiro (mRNA) associados com ativação de proteínas da via ubiquitina-proteassoma, incluindo aumento da expressão de E3 ubiquitina ligase do anel muscular 1 (MuRF1) e do Box F da atrofia muscular (MAFbx), também conhecido como atrogina-1 (BODINE; BAEHR, 2014; MURTON; CONSTANTIN; GREENHAFF, 2008). Marzuca-Nassr et al. (2019) relataram aumento da expressão de atrogina 1 e MURF-1 após apenas 5 dias de suspensão dos membros inferiores no músculo sóleo e aumento da expressão de atrogina 1 no músculo extensor longo dos dedos (EDL) (MARZUCA-NASSR et al., 2019). Substratos de MAFbx e MuRF1 são os fatores de iniciação da eIF3-f (subunidade F do fator 3 de iniciação da tradução eucariótica) e das cadeias de miosina, respectivamente. Acredita-se que a MuRF1 induz atrofia muscular, pelo menos em parte, ao atacar o filamento espesso do sarcômero e ocasionar a proteólise de proteínas de miosina. Por outro lado, a atividade MAFbx resulta em atrofia muscular através da regulação negativa da síntese de proteínas (EGERMAN; GLASS, 2014).

Os principais fatores de transcrição relacionados com a regulação da MAFbx e MURF-1 pertencem a família O da proteína FOX (FOXO 1, 3 e 4) e ao fator nuclear kappa B (NF-kB) (SANDRI et al., 2004). Entretanto, tendo em vista que muitos dos estudos disponíveis foram realizados em roedores (desuso ou modelo experimental de doenças), a afirmação de que o mesmo processo ocorre em humanos no desuso não complicado ou não patológico torna-se pouco acurada (MCGLORY; PHILLIPS,

2015). Além disso, estudos *in vivo* esbarram nas limitações técnicas e clínicas para mensurar a DPM, tornando os resultados mais escassos (RUDRAPPA et al., 2016). Assim, é possível afirmar que a atrofia muscular esquelética é caracterizada por diminuição da síntese proteica e/ou aumento da degradação proteica a depender da condição e espécie estudada. A figura 1 apresenta um resumo simplificado dos mecanismos intracelulares responsáveis pela síntese e degradação proteica, assim como potenciais estimuladores.

Figura 1. Vias de sinalização (simplificada) envolvidas no controle da atrofia e hipertrofia do músculo esquelético.



Fonte: o autor, 2022. A sinalização ativada pelo fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF1), pelo exercício físico resistido e pelo consumo de aminoácidos regula positivamente a massa muscular, principalmente por meio da indução da síntese de proteínas através da ativação da mTOR. Regulados pela FOXO e NF-κB, o aumento da MuRF1 e do MAFbx está, por sua vez, relacionado à atrofia muscular. Substratos de MAFbx e MuRF1 são os fatores de iniciação da eIF3-f e das cadeias de miosina, respectivamente. Alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR): proteína regulatória de mTOR (RAPTOR), proteína 8 Sec13 mamífero letal (mLST8), proteína de interação mTOR contendo domínio DEP (DEPTOR) e o substrato de Akt rico em prolina, de 40 kDa (PRAS40); proteína ribossômica S6 quinase 1 de 70 kDa (P70S6K1) e proteína de ligação ao fator de iniciação eucariótico 4E (4EBP1). família O da proteína FOX (FOXO), E3 ubiquitina ligase do anel muscular 1 (MuRF1) e do Box F da atrofia muscular (MAFbx), factor nuclear kappa B (NF-κB), subunidade F do fator 3 de iniciação da tradução eucariótica (eIF3-f), cadeia leve de miosina (MyLC), cadeia pesada de miosina (MyHC).

É importante ainda destacar outros processos que estão relacionados com a hipertrofia muscular, tornando este processo complexo e multifatorial (PETRELLA et al., 2008). É bem estabelecido que este processo é resultante da estimulação de vias miogênicas e endócrinas, ativação de células satélites e liberação de miocinas (LEE; JUN, 2019; SCHOENFELD, 2010). Cornish et al. (2020) relataram recentemente os seis paradigmas mecanicistas que respaldam o entendimento atual das vias de sinalização que mediam os estímulos hipertróficos. Esses paradigmas se relacionam entre si e incluem: células satélites; controle de proteínas translacionais e de RNAm transcricionais; mecanotransdução; fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos; controle sensorio motor; células não miogênicas no músculo (CORNISH et al., 2020). Embora as vias de sinalização que regulam a síntese e degradação proteica esquelética sejam complexas e interligadas, a sinalização de IGF-I/insulina é considerada o principal gatilho para o controle do equilíbrio proteico (KOBAYASHI et al., 2019). Isso acontece devido sua interação com as proteínas quinases (ex. Akt) e seus alvos *downstream* (mTOR e fatores de transcrição), mas também por estimular células satélites e ser regulada por exercícios, miocinas e hormônios anabólicos (KANDALLA et al., 2011; KOBAYASHI et al., 2019). Portanto, o entendimento destes processos possibilita o estudo de estratégias que possam favorecer a síntese proteica muscular, seja em indivíduos saudáveis ou que apresentam resistência ao anabolismo (ex. idosos) (GUALANO et al., 2016) e/ou perda excessiva de massa muscular devido a doenças e condições (ex. caquexia) (KOBAYASHI et al., 2019).

2.4 CREATINA: METABOLISMO E APLICAÇÕES

Como visto, é sabido que o desuso da musculatura esquelética, em geral, resulta em redução da massa muscular por ocasionar, principalmente, redução da síntese proteica muscular (SPM) (GLOVER et al., 2008; PHILLIPS; GLOVER; RENNIE, 2009). Os principais determinantes exógenos do balanço proteico no músculo esquelético são a atividade física e a disponibilidade de nutrientes (ATHERTON; SMITH, 2012). Desta forma, a presença de fraqueza muscular e redução da massa muscular sugerem que os portadores de PC podem se beneficiar através da suplementação de aminoácidos e outras substâncias com potencial

anabólico que visem o aumento de força e/ou massa muscular. Dentre essas manipulações nutricionais, podemos incluir a suplementação com a Cr.

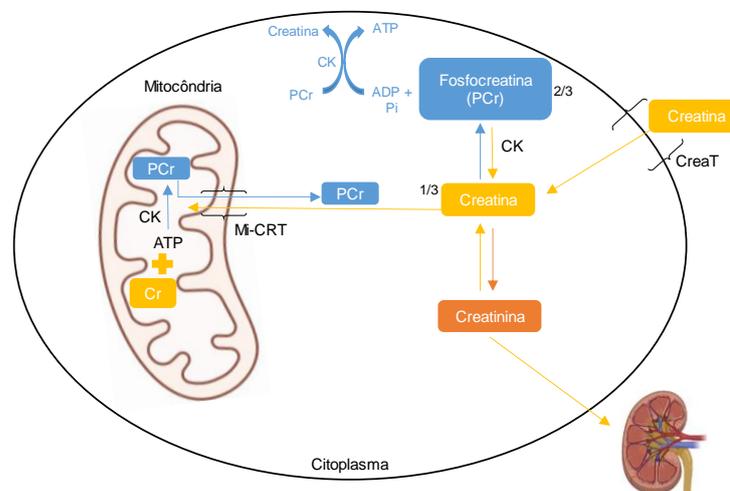
Descoberta em 1832 por Michel Eugene Chevreul, a Cr é uma amina nitrogenada encontrada principalmente na musculatura esquelética (95%) (HALL; TROJIAN, 2013) e em pequenas quantidades no cérebro, rins, fígado e testículos (PERSKY; BRAZEAU, 2001). Além da sua produção endógena (~1g/dia) pelos rins e fígado a partir dos aminoácidos glicina, arginina e metionina, que representa metade da necessidade diária (BROSNAN; BROSNAN, 2016; WALKER, 1979), ela pode ser obtida pela alimentação a partir de alimentos como carne, peixe e sementes (PERSKY; BRAZEAU, 2001) ou suplementos alimentares (KREIDER et al., 2017). A primeira etapa da produção endógena da Cr acontece nos rins, a partir dos aminoácidos glicina e arginina, com formação da ornitina e ácido guanidinoacético (GAA) com participação da enzima arginina glicina amidinotransferase (AGAT). A segunda etapa ocorre no fígado, a partir da metilação do ácido guanidinoacético pela enzima guanidinoacetato N-metiltransferase (GAMT) com participação da S-adenosil metionina (BROSNAN; BROSNAN, 2016; DA SILVA et al., 2014; PERSKY; BRAZEAU, 2001). Os rins, pâncreas, fígado e algumas regiões do cérebro possuem AGAT, mas a grande maioria do GAA é formado nos rins e convertido à Cr no fígado (BROSNAN; BROSNAN, 2016; DA SILVA et al., 2014; PERSKY; BRAZEAU, 2001). Esta síntese é influenciada por hormônios da tireoide, hormônio do crescimento, testosterona, ornitina e deficiências alimentares (jejum, vitamina E) (WALKER, 1979; WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000).

A Cr exógena, devido a sua estrutura semelhante a aminoácidos básicos, é absorvida no intestino delgado a partir de transportadores de aminoácidos, peptídeos ou especializados (PERSKY; BRAZEAU, 2001). Quando disponível no sangue, a Cr endógena ou exógena circulante atravessa a membrana celular através de transportadores de sódio-cloreto denominados CreaT (PERSKY; BRAZEAU, 2001; WALZEL et al., 2002). Catecolaminas, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), insulina e exercícios podem influenciar o transporte de Cr para as células (WALKER, 1979; WYSS; KADDURAH-DAOUK, 2000). Dentro das células, 2/3 da Cr é fosforilada pela enzima Cr quinase, formando a fosfocreatina ou creatina fosfato (PCr), enquanto 1/3 permanece na forma livre (WALZEL et al., 2002) (Figura 2). O total de Cr (PCr + Cr) gira em torno de 120 mmol/kg de massa muscular magra para um indivíduo de 70kg que segue uma dieta com carnes e peixes. Vegetarianos, por

sua vez, podem apresentar uma redução na concentração de até 50% dependendo do local avaliado (KAVIANI; SHAW; CHILIBECK, 2020).

A PCr possui um importante papel no sistema energético fosfagênio adenosina trifosfato (ATP)/fosfocreatina (PCr), fornecendo fosfato para a ressíntese do ATP a partir da adenosina difosfato (ADP) (WALLIMANN et al., 1992). Durante exercícios de curta duração e alta intensidade, o ATP disponível nas células é rapidamente utilizado e precisa ser ressintetizado para que a intensidade possa ser mantida por mais algum tempo (VAN LOON et al., 2003; VOLEK et al., 1999). É bem documentado que a fosfocreatina é capaz de sustentar a ressíntese de ATP de forma direta (doação do grupo fosfato para o ADP) em exercícios tipicamente com duração inferior a 30 segundos (BRANCH, 2003; RAWSON; VOLEK, 2003). De fato, a quebra da PCr em fosfato inorgânico (Pi) e Cr a partir da enzima Cr quinase (CK) fornece em torno de 10,3 calorias de energia livre que pode ser utilizada para a ressíntese do ATP a partir de ADP e Pi. Além disso, a Cr citoplasmática na sua forma livre (1/3) também pode participar do metabolismo do ATP a partir da sua fosforilação mitocondrial (via transportadores CreaT mitocondrial) (BALESTRINO; ADRIANO, 2019; WALZEL et al., 2002). A PCr formada na mitocôndria retorna para o citoplasma e fica disponível para a ressíntese do ATP (BALESTRINO; ADRIANO, 2019; WALZEL et al., 2002) (Figura 2). Portanto, aumentando as reservas de fosfocreatina com a suplementação, a crença era de que se poderia diminuir a fadiga muscular e aumentar o desempenho.

Figura 2. Metabolismo intracelular da Cr.



Fonte: o autor, 2022. A Cr entra no citoplasma a partir de transportadores de Cr (CreaT). No citoplasma, 1/3 da Cr permanece na forma livre, enquanto 2/3 é fosforilada para a formação da fosfocreatina (PCr) a partir da enzima Cr quinase (CK), e pode participar da ressíntese do ATP. Parte da Cr pode ser metabolizada de forma não enzimática, formar creatinina e ser excretada pelos ríns. Adicionalmente, a Cr livre pode se encaminhar para a mitocôndria e se acoplar ao ATP produzido na fosforilação oxidativa, retornando ao citoplasma como PCr.

Já nos anos 1990, este composto passou a ser estudado e considerado como um recurso ergogênico, aumentando o desempenho em exercícios de alta intensidade e curta duração por aumentar em torno de 20% a concentração de Cr intracelular (VAN LOON et al., 2003; VOLEK et al., 1999). Esse aumento na concentração é obtido com doses de 20g (ou ~0.3g/kg) ao dia (4 porções de ~5g) por 5 dias ou 3-5g (ou ~0.06g/kg) por dia por aproximadamente 30 dias (VAN LOON et al., 2003; VOLEK et al., 1999). Aumentos maiores em resposta à ingestão de Cr podem ser obtidos combinando o suplemento com exercício, carboidrato ou carboidrato/proteína, embora o acúmulo máximo de Cr em médio a longo prazo (semanas a meses) parecer não ser afetado por nenhum desses fatores (HULTMAN et al., 1996). A habilidade bem conhecida de ressíntese de ATP também pode ser importante para além do desempenho esportivo, em condições em que a produção de energia é limitada (isquemia e hipóxia) ou insuficiente devido à alta demanda (fadiga mental e doenças). Assim, a suplementação de Cr na sua forma monohidratada (CM) passou a ser considerada para a recuperação e reabilitação, como por exemplo, no tratamento de doenças neurodegenerativas que apresentam atrofia muscular ou fadiga secundária à produção de energia prejudicada (PERSKY; BRAZEAU, 2001). Isso também se deve ao fato da descoberta de mecanismos subjacentes ao efeito anabólico e neuroprotetor da Cr (DOLAN; GUALANO; RAWSON, 2019).

São múltiplos os mecanismos pelos quais a Cr está relacionada com o aumento de força e aumento da massa muscular (DELDICQUE et al., 2007; SAFDAR et al., 2008; SAKKAS; SCHAMBELAN; MULLIGAN, 2009; WALL; VAN LOON, 2013; WILLOUGHBY; ROSENE, 2003). Evidências iniciais propuseram que o efeito osmótico observado com a suplementação de Cr serve como um estressor celular, ocasionando estímulo anabólico em vias de sinalização para SPM (SAFDAR et al., 2008). Outras evidências sugerem que a Cr afeta diretamente a síntese proteica muscular através da modulação de componentes na via alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) (DELDICQUE et al., 2007; SAKKAS; SCHAMBELAN; MULLIGAN,

2009; WALL; VAN LOON, 2013). A Cr também influenciou diretamente processos miogênicos (formação do tecido muscular) a partir da secreção de miocinas como a miostatina e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), além da alteração na expressão de fatores regulatórios miogênicos, resultando em aumento da atividade mitótica de células satélites (WILLOUGHBY; ROSENE, 2003). Hespel et al. (2001) relataram que a suplementação com Cr (5-20g/dia) facilitou a reabilitação da atrofia induzida por desuso a partir da regulação do fator regulador miogênico 4 (MRF4) e aumento da expressão de proteínas miogênicas (HESPEL et al., 2001). Os autores relataram aumento de mais de 10% da área das fibras musculares e mais de 25% de força máxima durante a reabilitação (HESPEL et al., 2001). Outro estudo relatou aumento de massa muscular magra e força após suplementação antes e durante a reabilitação de indivíduos com doença pulmonar crônica (FULD et al., 2005). Junto com o exercício físico resistido, Hass et al. (2007) observaram que a suplementação com Cr em pacientes com doença de Parkinson promoveu grande aumento de força e capacidade funcional (HASS; COLLINS; JUNCOS, 2007).

Com relação a outros efeitos da Cr, em um estudo realizado com triatletas, a suplementação com Cr foi capaz de reduzir os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , INF α , IL-1b), assim como os níveis da prostaglandina E₂ (PGE₂) (BASSIT; CURI; COSTA ROSA, 2008). Em outro estudo, dessa vez realizado com ratos Wistar, a suplementação com Cr atenuou os níveis de ERO nos músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL), mas não modificou os níveis de enzimas antioxidantes. Os autores concluíram que os efeitos da Cr nos níveis de ERO podem estar relacionados a sua ação direta sobre o radical superóxido (GUIMARÃES-FERREIRA et al., 2012). Ainda em ratos Wistar, a suplementação com Cr foi capaz de prevenir a atrofia muscular através da atenuação da inflamação sistêmica e das vias de degradação proteica em ratos portadores do tumor Walker-256 (CELLA et al., 2020). Os autores relataram especificamente redução dos níveis plasmáticos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), além de redução de reguladores da atrofia muscular atrogina-1 e E3 ubiquitina-proteína ligase TRIM63 (MuRF-1) (CELLA et al., 2020).

Corroborando com os estudos acima, em um estudo de revisão, Tarnopolsky (2011) apresenta 7 mecanismos pelos quais a Cr pode ser benéfica para indivíduos que possuem algum tipo de desordem neuromuscular. Os mecanismos são: aumento da massa muscular; aumento da força; aumento da atividade repetitiva de alta

intensidade; ativação de células satélites; tamponamento de prótons; atividade antioxidante; redução da apoptose; e redução do cálcio intracelular (TARNOPOLSKY, 2011). Por fim, Gualano et al. (2016) afirmaram que a Cr pode exercer seus efeitos na musculatura esquelética de forma direta (atributos físico-químicos do composto e modulação gênica) ou indireta (via regulação do volume celular e fornecimento de energia) (GUALANO et al., 2016). Assim, o corpo de evidências em humanos e roedores apresentado sugere que a Cr pode exercer seus efeitos através de múltiplos mecanismos com impactos convergentes na síntese proteica/miogênese, inflamação e estresse oxidativo (DELDICQUE et al., 2007; SAFDAR et al., 2008; SAKKAS; SCHAMBELAN; MULLIGAN, 2009; TARNOPOLSKY, 2011; WALL; VAN LOON, 2013; WILLOUGHBY; ROSENE, 2003). Além do foco na plasticidade da musculatura esquelética, a suplementação com Cr tem sido estudada visando a sua possível ação neuroprotetora.

Comparado ao músculo esquelético, apenas uma pequena porcentagem da Cr corporal total está no cérebro (<5%) (DOLAN; GUALANO; RAWSON, 2019). Apesar disso, ela é considerada essencial para a produção de energia devido a alguns fatos: 1. presença de isoformas da Cr quinase (CK) no sistema nervoso central; 2. diversos transtornos mentais provocados pela depleção da Cr no cérebro em síndromes de deficiência de Cr; 3. reversão parcial destes transtornos a partir da suplementação. Ao contrário do músculo esquelético, o cérebro pode sintetizar Cr e não parece depender da produção endógena de outros órgãos (BRAISSANT; BACHMANN; HENRY, 2007; DOLAN; GUALANO; RAWSON, 2019). Porém, a permeabilidade do cérebro à Cr circulante parece ser limitada, provavelmente devido à ausência da expressão do transportador de Cr nos astrócitos. Assim, acredita-se que a dose recomendada de Cr eficaz para aumentar a Cr cerebral pode ser maior que a dose necessária para aumentar a Cr na musculatura esquelética (ou seja, >20g/dia) (BÉARD; BRAISSANT, 2010; DOLAN; GUALANO; RAWSON, 2019). Dolan et al. (2018) relataram que a suplementação com Cr facilita uma regeneração mais constante de ATP no cérebro em situações como: turnover acelerado de ATP no cérebro (ex. desempenho de tarefas cognitivas complexas) e interrompimento do turnover de ATP (ex. hipóxia, privação de sono e várias condições neurológicas). Assim, a Cr no sistema nervoso central parece ser essencial para um bom funcionamento da atividade neural e sua suplementação pode ser útil em situações que envolvem prejuízos bioenergéticos (DOLAN; GUALANO; RAWSON, 2019).

Com relação à neuroproteção atribuída a esta substância, estudos *in vitro* e *in vivo* relataram que a Cr apresenta propriedades anti-apoptótica, anti-excitotóxica e antioxidante (BENDER et al., 2005; GENIUS et al., 2012; LAWLER et al., 2002; O’GORMAN et al., 1997). Estas propriedades tornaram a Cr uma candidata atrativa no tratamento de diversos transtornos neurodegenerativos, incluindo doença de Huntington (DH), Alzheimer (DA) e Parkinson (DP) (BEAL, 2011; BREWER; WALLIMANN, 2000; MATTHEWS et al., 1998, 1999; ROSAS et al., 2014; VIS et al., 2004), e de citopatias mitocondriais (TARNOPOLSKY; ROY; MACDONALD, 1997). Ao observar a fisiopatologia, é possível observar que, além da clássica perda de diferentes populações de neurônios, muitos processos foram associados ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas. Esses processos incluem a desregulação transcricional, mas também a excitotoxicidade, estresse oxidativo, depleção de energia e disfunção mitocondrial. Todos esses processos têm sido implicados na DH, DP, esclerose lateral amiotrófica (ALS) e DA (BEAL, 2011; LIN; BEAL, 2006). As mitocôndrias, por sua vez, não são apenas fundamentais para a bioenergética celular, mas também são mediadores chave da apoptose e podem estar ligadas direta ou indiretamente a muitos dos outros processos deletérios envolvidos na neurodegeneração (BEAL, 2011; LIN; BEAL, 2006).

Em modelo animal de doença de Huntington, a suplementação com Cr foi associada com menor volume de lesão e maiores níveis cerebrais de ATP e PCr (MATTHEWS et al., 1998), além de neuroproteção significativa, melhora no desempenho motor e maior sobrevida global (ANDREASSEN et al., 2001; FERRANTE et al., 2000). Zhu et al. (2004) relataram redução do dano cerebral induzido pela isquemia em camundongos tratados de forma profilática com Cr (ZHU et al., 2004). Allah Yar et al. (2015), após suplementação com Cr por 10 semanas relataram neuroproteção e melhora da aprendizagem e memória após encefalopatia hipóxico-isquêmica em camundongas (ALLAH YAR; AKBAR; IQBAL, 2015). Em camundongos expostos ao estresse crônico leve por 4 semanas, a suplementação com Cr associada ao exercício ocasionou maior neurogênese hipocampal através da ativação da via Wnt/GSK3 beta/beta-catenina (LEEM; KATO; CHANG, 2018). Por fim, é importante destacar que, apesar de apresentar efeitos neuroprotetores, a Cr não precisa necessariamente aumentar as concentrações nos diferentes locais do cérebro para apresentar os efeitos. Recente revisão sistemática que avaliou os efeitos da suplementação com Cr na neuroproteção ocasionada pela encefalopatia hipóxico-

isquêmica perinatal apresentou estudos que encontraram efeitos positivos sem aumentos nas concentrações cerebrais, o que pode estar associado aos efeitos nas células musculares lisas e/ou no endotélio vascular (TRAN et al., 2021). Ademais, as propriedades antiinflamatórias e antioxidativas da Cr já foram citadas anteriormente. Assim, a modulação da função cerebrovascular, da inflamação sistêmica e/ou do estresse oxidativo podem ser os mecanismos pelos quais a Cr age como neuroprotetora apesar de suas concentrações cerebrais permanecerem inalteradas (TRAN et al., 2021). Como já mencionado, a PC tipicamente envolve uma variedade de desordens neuromusculares e musculoesqueléticas, assim, o estudo de estratégias que possam reduzir as sequelas observadas, incluindo a Cr e o exercício resistido, torna-se essencial.

2.5 EXERCÍCIO FÍSICO RESISTIDO

Diversos estudos apresentaram o exercício físico como uma estratégia para diminuir o risco de doenças cardiovasculares, pulmonares, imunológicas, metabólicas e neurodegenerativas (HAMER; CHIDA, 2008; LANCASTER; FEBBRAIO, 2014; MANTOANI et al., 2017; NYSTORIAK; BHATNAGAR, 2018; PEDERSEN; ROHDE; OSTROWSKI, 1998). Apesar dos mecanismos celulares não serem totalmente compreendidos, é amplamente aceito que o exercício físico feito de forma regular promove efeitos sinérgicos em diferentes órgãos e tecidos, especialmente entre músculos e cérebro, músculos e pulmões, e músculos e coração (PINHO; AGUIAR; RADÁK, 2019). De fato, o exercício do tipo aeróbico é o mais associado a mecanismos neuroprotetores (RADAK et al., 2016). Estudos relataram benefícios para o cérebro, incluindo melhora da função cognitiva (WILLIAMS; LORD, 1997) e aumento da expressão de fatores neurotróficos em diversas regiões do cérebro em humanos e em ratos (JEON; HA, 2017; TONG et al., 2001). Entretanto, estudos recentes têm focado no exercício de resistência visando obter benefícios semelhantes, como na doença de Parkinson (TUON et al., 2014) e Alzheimer (JENSEN et al., 2019). Radak et al. (2014) relataram o exercício resistido como uma ferramenta importante para a manutenção, desenvolvimento e recuperação de atividades cerebrais por meio de adaptações neuroquímicas específicas (RADAK et al., 2014). Ao utilizar treinamento resistido em escada por 4 semanas em ratos Wistar, Gomes et al. (2014), relataram efeitos benéficos no giro denteado do hipocampo (NOVAES GOMES et al., 2014).

Recente revisão, realizada por Guo et al. (2020), também apresenta os efeitos do exercício sobre órgãos de roedores. Os métodos de intervenções de exercícios envolveram principalmente o uso de esteiras, corrida voluntária sobre rodas, corrida forçada de rodas, natação e treinamento de resistência (GUO et al., 2020). Verificou-se que, independentemente do método de exercício específico utilizado, efeitos positivos em várias doenças sistêmicas e funções orgânicas foram observados (GUO et al., 2020). O exercício por si é um potente estímulo para a remodelação e recondição do músculo esquelético (EGAN; ZIERATH, 2013). Alterações na carga, frequência e na duração da atividade contrátil pode induzir diferentes adaptações fenotípicas específicas para a natureza do estímulo (EGAN; ZIERATH, 2013). O exercício de resistência é caracterizado por repetidas séries de contrações carregadas que resultam no rápido recrutamento de fibras musculares do tipo 2 e estimulação da síntese proteica muscular (MPS) (EGAN; ZIERATH, 2013; PHILLIPS, 2009). Quando combinado com nutrição adequada, o exercício resistido melhora a força muscular em parte por meio de um aumento do diâmetro radial das fibras musculares individuais, um processo denominado hipertrofia (CLAASSEN et al., 1989). O aumento do tamanho do músculo esquelético com o exercício resistido deve-se ao aumento da área de secção transversal (ASTm) das fibras musculares individuais (CLAASSEN et al., 1989).

Assim como a Cr, o exercício físico resistido ocasiona hipertrofia na musculatura esquelética a partir de múltiplas vias de transdução de sinais, como por exemplo, a ativação da via mTOR, descrita anteriormente (MCGLORY; PHILLIPS, 2015; SONG et al., 2017). É importante destacar ainda que o aumento da massa muscular proporciona diversos benefícios para o organismo, tendo em vista que o músculo esquelético é considerado um órgão secretor (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012). As substâncias produzidas, expressadas e liberadas pela musculatura esquelética, denominadas miocinas, exercem efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos no organismo. Dentre esses efeitos estão, por exemplo: aumento da oxidação do tecido adiposo, aumento da sensibilidade à insulina, osteogênese e redução de processos inflamatórios (CAREY et al., 2006; HAMRICK, 2011; HOJMAN et al., 2009; WUNDERLICH et al., 2010). O exercício resistido também pode influencia vias de degradação proteica. Son et al. (2016) aplicaram um modelo de imobilização dos membros posteriores em ratos Sprague-Dawley que em seguida realizaram treinamento resistido em escada (SON et al., 2016). Os pesquisadores avaliaram a

capacidade do treinamento em reduzir os níveis da proteína osteonectina (Secreted protein acidic and rich in cysteine – SPARC), associada com atrofia miofibrilar, e relataram redução da mesma no músculo plantar (SON et al., 2016). Os autores também relataram aumento de força e menor redução da área seccional transversal nas células dos músculos imobilizados (SON et al., 2016). Por outro lado, não há estudos com modelos experimentais de PC e exercício resistido. Entretanto, estudos realizados em humanos com PC observaram efeitos positivos.

A motricidade funcional afetada pelas limitações da PC pode ser melhorada com intervenção terapêutica precoce (MORGAN et al., 2016). Anteriormente, havia uma preocupação sobre a possibilidade do exercício de resistência causar aumento na espasticidade (ANDERSSON et al., 2003). Entretanto, revisões sistemáticas mostraram a partir daí que o exercício de resistência pode beneficiar os pacientes de PC com relação à função e força muscular (COLLADO-GARRIDO et al., 2019; DODD; TAYLOR; DAMIANO, 2002; PARK; KIM, 2014). Um estudo recente mostrou que o exercício resistido é um dos mais utilizados entre os fisioterapeutas que tratam pacientes de PC (TAFLAMPAS et al., 2018). A primeira revisão sistemática para reunir dados de ensaios aleatórios de intervenções de fortalecimento em crianças e adolescentes com PC foi publicada em 2009. Os autores relataram que a intervenção não aumentou a força e não alterou o nível de atividade na PC (SCIANNI et al., 2009). Entretanto, a estimulação elétrica foi incluída como uma intervenção de fortalecimento e diferentes tipos de PC foram incluídos. Outra revisão relatou aumento na força muscular em adultos com PC após o exercício de força. Da mesma forma, diferentes tipos de PC foram incluídos nesta revisão (ROSS; MACDONALD; BIGOUILLE, 2016). Mais tarde, Collado-Garrido et al. relataram um impacto positivo do exercício de resistência na função motora em indivíduos com menos de 18 anos de idade com PC. Os autores não especificaram o tipo de PC e vários estudos que utilizaram treinamento funcional foram incluídos (COLLADO-GARRIDO et al., 2019). Um estudo mais recente também observou que o treinamento de resistência tem efeitos funcionais e de atividade positivos em crianças e adolescentes com PC sem aumentar a espasticidade (MERINO-ANDRÉS et al., 2022). Portanto, é importante avaliar separadamente os efeitos do exercício de resistência nas habilidades motoras e musculares em diferentes tipos de PC. Além disso, é importante entender os mecanismos fisiológicos por trás dos benefícios obtidos com o exercício resistido.

Assim, a utilização de modelos experimentais torna possível o esclarecimento de diversos possíveis efeitos benéficos do exercício resistido na PC, tendo em vista que é possível realizar análises mais específicas do que em estudos com humanos. Portanto, no presente projeto, pretende-se explorar essa perspectiva do exercício de resistência nas alterações musculoesqueléticas em modelo experimental de PC. Além disso, como visto anteriormente, é importante continuar estudando impacto da exposição a Cr em condições perinatais como a PC. Nesse sentido, além de avaliar os efeitos do exercício de resistência, o presente estudo irá avaliar os efeitos periféricos e centrais após suplementação com Cr em animais submetidos a um modelo experimental de PC.

3 HIPÓTESE

O tratamento com creatina reduz a inflamação hipocampal e os danos locomotores, e aumenta o peso corporal e a força muscular de ratos submetidos à paralisia cerebral experimental.

O tratamento com exercício resistido aumenta a força e massa muscular esquelética, e reduz os danos locomotores de ratos submetidos à paralisia cerebral experimental.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar as repercussões do tratamento com creatina ou exercício resistido nas alterações neuromusculares observadas em ratos submetidos à paralisia cerebral experimental.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Em ratos submetidos à paralisia cerebral que receberão tratamento com creatina ou exercício resistido, avaliar:

- Experimento 1 (com creatina):
 - a) Peso corporal;
 - b) Consumo alimentar;
 - c) Características dinâmicas da marcha;
 - d) Força muscular;
 - e) Densidade e ativação de micróglia no hipocampo;
 - f) Expressão de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo.

- Experimento 2 (com exercício resistido):
 - a) Peso corporal;
 - b) Consumo alimentar;
 - c) Características estáticas da marcha;
 - d) Força muscular;
 - e) Peso e massa muscular de músculos da pata posterior;
 - f) Expressão das proteínas da via de síntese proteica.

5 MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 66 filhotes machos da linhagem Wistar. As fêmeas foram utilizadas apenas para compor a ninhada. Os animais foram obtidos na colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Todos os animais foram mantidos em ambiente com ciclo invertido de luz (21:00 as 9:00) e escuridão (09:00 às 21:00 h), temperatura $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e com livre acesso à água e ração (Presence), mantidos em gaiolas de polipropileno (46cmx34cmx20cm) coberta com maravalha estéril. Para obtenção de neonatos, foram acasalados animais machos e fêmeas nulíparas (proporção 1:2), não consanguíneos, com idade entre 90 e 120 dias. A gestação foi confirmada por acompanhamento da evolução do peso corporal. Após o nascimento dos filhotes foram utilizadas ninhadas com 8-9 animais. O projeto seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA), de acordo com a lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, e as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals e foi submetido a Comissão de Ética em Uso animal (CEUA) da UFPE (nº 0019/2019).

5.2 ANÓXIA PERINATAL E RESTRIÇÃO SENSÓRIO-MOTORA

O modelo experimental de PC foi baseado nos experimentos de Strata et al. (2004) e foi realizado apenas nos filhotes machos. Este modelo associa a anóxia perinatal a um modelo de restrição sensório-motora dos membros inferiores semelhante à falta de movimento ocorrida na PC. Ao nascer, os filhotes foram submetidos a dois episódios de anóxia, o primeiro no dia do nascimento, considerado o P0 e o segundo no P1. Para realização da anóxia, os filhotes foram colocados dentro de uma câmara de vidro parcialmente imersa em água a 37°C e expostos a nitrogênio (100%) a 9L/min por 12 minutos cada dia. Os filhotes foram colocados em temperatura ambiente até recuperação da coloração e respiração normal e devolvidos as suas respectivas mães após tal procedimento. Do P2 ao P28 foi realizada a restrição sensório-motora durante 16 horas por dia (das 15h às 7h do dia seguinte), e nas 8 horas restantes foi permitida a livre movimentação do animal. Para a imobilização sensório-motora, um molde de epóxi foi usado de forma que apenas movimentos limitados da articulação do quadril fossem permitidos, deixando os membros

posteriores estendidos com o auxílio de fita adesiva complementar ao molde. A imobilização não impede a eliminação de urina e fezes, bem como os cuidados maternos (DELCOUR et al., 2018b).

5.3 SUPLEMENTAÇÃO COM CREATINA

Os filhotes foram alocados de duas formas aleatórias conforme ao tratamento com Cr e treinamento resistido: A) a partir do 21º dia de vida pós natal: 1- Tratados com Cr via gavagem (300mg/kg/dia) acordo com Murai et al. (2015); 2- Água destilada (veículo) via gavagem (MURAI et al., 2015). B) após o 29º dia de vida: 1- Tratados com Cr na água *ad libitum* (1.5 g/L); 2- Água. O consumo da solução com Cr foi mensurado diariamente do dia 25 ao 30, e depois a cada 10 dias, e a solução foi trocada a cada dois dias. Quando ofertada na água, na concentração de 1.5 g/L, o objetivo foi administrar, no mínimo, 300mg/kg/dia até o final do estudo. Para a gavagem, utilizamos o método descrito por Butchbach et al. (2007). O filhote foi segurado pela pele na parte de trás do pescoço e a agulha de gavagem foi inserida suavemente na cavidade oral apenas até a agulha atingir a faringe, reduzindo o estresse para o animal. O composto foi lentamente injetado na cavidade oral e a agulha de gavagem foi removida da boca (BUTCHBACH et al., 2008).

5.4 EXERCÍCIO DE RESISTÊNCIA

O modelo a ser usado para o treinamento foi adaptado de Mônico-Neto et al. (2015) e Antonio-Santos et al. (2016). Neste modelo, os ratos subiram uma escada (80 graus) no período pós-natal com uma carga fixada nas suas caudas. Antes do programa de treinamento ser iniciado, para que o animal reconhecesse a escada, um período de adaptação de 3 dias foi aplicado, entre o 29º e 31º dia de vida pós-natal. No dia 29, o animal reconheceu o aparato a partir da caixa inferior e superior, sendo colocado 2 minutos para a exploração do ambiente. No dia 30 ele foi colocado no ponto 2 e subiu 10 vezes até o topo. No dia 31 o animal subiu a partir do ponto 1 com todo o aparato fixado na sua cauda, porém sem peso. Após esta adaptação houve um dia de descanso para o animal e no dia seguinte foi realizado um teste de sobrecarga máxima, realizado sempre no início de cada semana de treinamento a fim de determinar a carga com a qual o animal realizou o treinamento em cada semana. No primeiro teste de sobrecarga máxima, antes da primeira semana de treinamento, foi

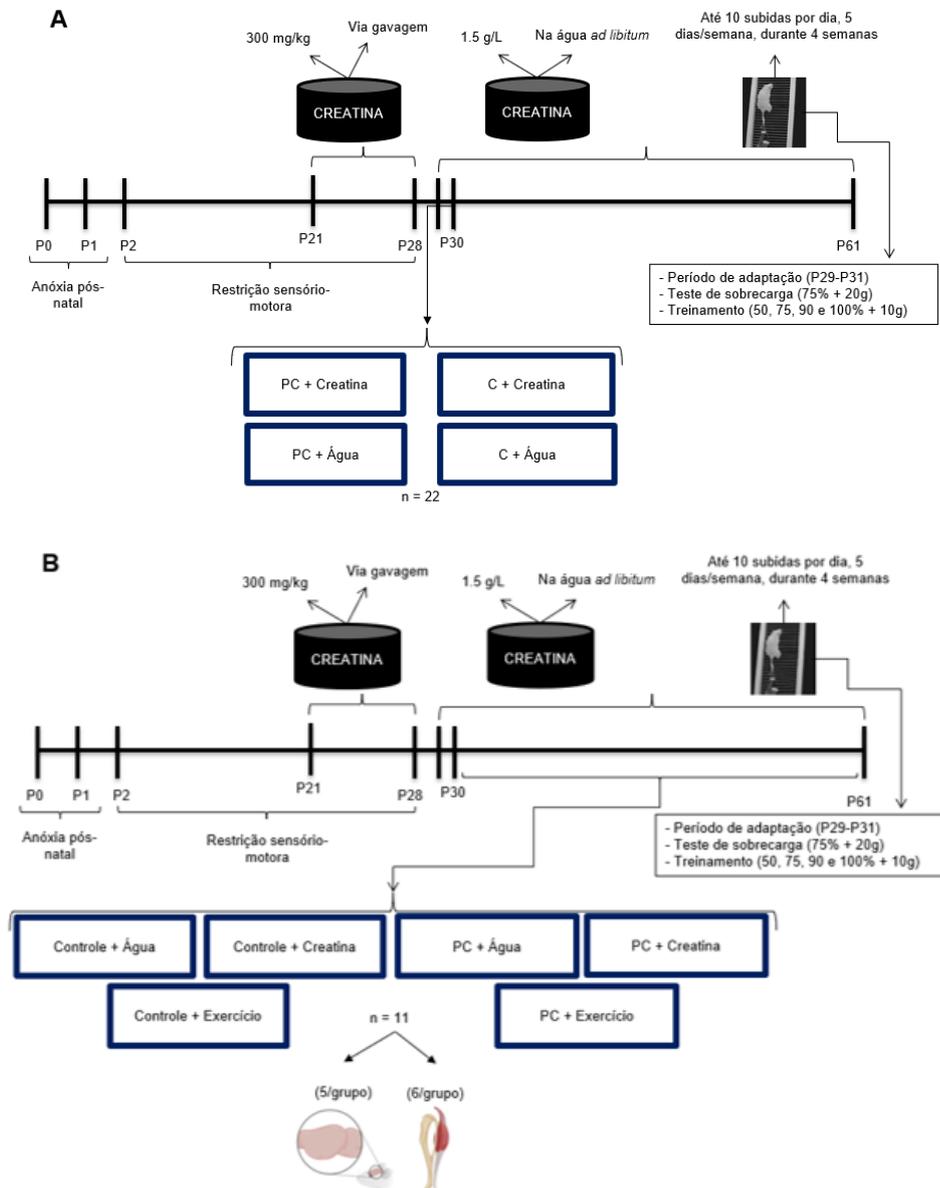
calculado 75% do peso do animal, que foi utilizado na primeira subida do teste. A partir da segunda subida foram acrescentados 20 g cada vez que o animal conseguiu subir, com o intervalo de descanso entre elas de 120 segundos. Em caso de falha, considerado quando o animal não consegue mais subir (extensão das patas anteriores, quase soltando), uma redução de 10g foi realizada para que a carga máxima pudesse ser definida com mais precisão. Em todos os outros testes de sobrecarga, ou seja, antes do início das semanas 2, 3 e 4, a carga para a primeira subida foi calculada como 75% da última carga máxima utilizada na semana de treinamento anterior. Esta adaptação no cálculo foi realizada visando a redução do número de subidas no teste de sobrecarga, o que não seria possível caso a primeira subida fosse realizada com 75% do peso corporal a partir da semana 2, pois a carga seria muito inferior ao máximo que o animal carregou no último dia de treinamento. Após a definição da carga máxima, as sessões foram realizadas com 50%, 75%, 90% e 100% da carga máxima do animal. A primeira subida foi realizada com 50%, a segunda com 75%, a terceira com 90% e a quarta com 100%. A partir da quinta subida, 10g foram acrescentados a cada subida realizada com sucesso. O tempo de descanso entre subidas durante o programa de treinamento foi de 90 segundos. Este programa de treino de resistência teve como plano 4-10 subidas por dia, 8-12 movimentos repetitivos por subida, 5 dias/semana (1 dia de descanso e 1 dia de teste de sobrecarga completando 7 dias), durante 4 semanas, com carga gradualmente acrescida. A escada utilizada foi adaptada do modelo de Antonio-Santos et al. (2016).

5.5 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Antes da inclusão do treinamento resistido, até o P30, os filhotes foram divididos em quatro grupos: 1) Controle veículo (C-A; n=22); 2) Controle creatina (C-CR; n=22); 3) Paralisia cerebral veículo (PC-A; n=22); 4) Paralisia cerebral creatina (PC-CR; n=22). A partir do P31, os animais foram divididos em (n = 11): 1) Controle veículo; 2) Controle creatina; 3) PC veículo; 4) PC creatina; 5) Controle treinado; 6) PC treinado. Tendo em vista a necessidade de coletar amostras frescas da musculatura esquelética e encéfalos pós-fixados, parte dos animais foram eutanasiados por decapitação (n=6 por grupo) e o restante por perfusão transcardíaca (n=5 por grupo). Os filhotes foram identificados através de marcações feitas com

violeta de genciana e o desmame ocorreu no 25º dia de vida. A figura 3 apresenta a divisão dos grupos experimentais nas diferentes fases do estudo.

Figura 3. Desenho experimental nas diferentes fases do estudo.



Fonte: o autor, 2022. (A) Antes do período do exercício resistido (B) Durante e após o exercício, 6 grupos experimentais.

5.6 ANÁLISES EXPERIMENTAIS

5.6.1 Análises comuns para os experimentos 1 e 2

Peso corporal - O peso corporal dos filhotes foi registrado ao nascimento (P0), no 1º, no 8º, no 14º dia de vida, e diariamente entre os dias 21 e 60.

Consumo alimentar e hídrico – O consumo alimentar coletivo (dupla do mesmo grupo experimental) foi avaliado todos os dias após o desmame, do P25 ao P30, seguido de análises a cada 10 dias até o P60 através do método de pesagem manual com balança digital (pesagem manual dos pellets antes e depois de um período de alimentação – 24h) (ALI; KRAVITZ, 2018). De forma semelhante, o consumo hídrico coletivo (dupla do mesmo grupo experimental) foi realizado pesando a própria garrafa com água (pesagem manual da garrafa antes e depois de um período de consumo – 24h) a cada 10 dias até o P60 após a aplicação da Cr na água *ad libitum* (ALI; KRAVITZ, 2018).

Análise da marcha em CatWalk - No 30º e 60º dia foi avaliada a marcha. A análise da locomoção foi realizada pelo método descrito por Herold et al. (2016) e Delcour et al. (2018a) utilizando o sistema de análise de locomoção (Gait analysis system for rodents CatWalk XT - Noldus). Este método consiste em avaliar a locomoção do animal em um corredor, sendo o animal filmado individualmente para mensuração de parâmetros da marcha. Os parâmetros avaliados foram: área máxima de contato e intensidade de contato. Este método foi escolhido em virtude do mesmo ser uma ferramenta eficiente em quantificar déficits na locomoção (DELCOUR et al., 2018b; HEROLD et al., 2016).

Estudo da força muscular - O teste de força da preensão dos membros anteriores foi realizado através de um aparelho digital (Animal GripStrength System - SD instruments). O animal agarra a barra de apoio exercendo uma força de tração sobre ela e o captor de força permite quantificar o pico de força de cada animal. O teste foi realizado nos dias 30 e 60 (TAKESHITA et al., 2017).

5.6.2 Análises exclusivas para o experimento 1 (PC e Cr)

Eutanásia e coleta das amostras - Para a obtenção dos encéfalos pós-fixados, no P61, os animais foram anestesiados com quetamina (0.1 µl/g, i.p.) e xilazina (0.06 µl/g, i.p.) e perfundidos com solução salina (PBS) seguida de solução de fixadora (4% de paraformaldeído em PBS 0,1 M, pH 7,4 a 4º C). Após a remoção dos encéfalos, eles foram pós-fixados na mesma solução fixadora a 4% overnight. Em seguida foram desidratados em solução crioprotetora (30% de sacarose em PBS 0.1 M) também a 4ºC durante o tempo necessário para atingir o fundo do recipiente. Foram realizados cortes seriados do cérebro de cada animal (30 µm de espessura) no criostato a -40ºC.

Os cortes foram mantidos em placas para cultura de células em solução anticongelante (60% etilenoglicol e 18.75% de glicose em PB 0.05M).

Análise quantitativa de micróglia no hipocampo – Para coloração da micróglia, seções do cérebro foram incubadas em 10% de H₂O₂ em metanol e posteriormente em 10% de H₂O₂ em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4), contendo 3% de Triton X-100 (PBT). Posteriormente, os cortes foram incubados a 4°C por 72h em anticorpo primário (rabbit anti-Iba1 / IAF1, 1: 10.000, Wako) diluído com 5% de soro de cavalo em PBT (SAAVEDRA et al., 2021). As seções foram então incubadas por 2h em temperatura ambiente em anticorpo secundário (biotinylated anti-rabbit antibody, 1:750, Sigma-Aldrich). Posteriormente, os cortes foram incubados com soluções do complexo avidina-biotina peroxidase (ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) e uma solução do kit de coloração de diaminobenzidina (DAB Kit; Vector Laboratories) para marcação da micróglia (SAAVEDRA et al., 2021). As seções de cada grupo foram realizadas em paralelo para evitar efeitos de coloração diferentes em cada grupo experimental. Os cortes foram então montados em lâminas gelatinizadas e lamínulas com Cytoseal (Thermo Scientific, EUA). Para avaliação de células microgliais Iba1⁺, 3 campos por seção para um total de 4-6 seções por cérebro (n=5 por grupo) no giro denteado do hipocampo (DG) (-2,80 a -4,15 mm bregma) foram selecionados aleatoriamente para avaliar a contagem de células da microglia (SAAVEDRA et al., 2021). Os campos selecionados foram analisados com microscópio óptico com aumento de 20x. O software ImageJ foi utilizado para a análise do número de células/área (SAAVEDRA et al., 2021). Células microgliais com uma pequena soma e poucos a numerosos processos foram consideradas micróglia ramificadas (tipos I-III), enquanto aquelas com uma grande soma ou corpo amebóide e processos mais espessos e curtos foram consideradas micróglia ativadas (tipos IV-V) (SAAVEDRA; NAVARRO; TORNER, 2018). Foram apresentados os dados de densidade de micróglia (n/mm^3 – Total de células dividido pela área avaliada x 1.000.000 x 0,001 x 40) e porcentagem de ativação das micróglia relativo ao total (ROQUE; OCHOA-ZARZOSA; TORNER, 2016).

Análise da expressão de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo por PCR em tempo real - O hipocampo foi homogeneizado em Trizol (Invitrogen, EUA) e o RNA total foi isolado usando um protocolo padrão de clorofórmio/isopropanol. Um µg de RNA total foi então transcrito usando iniciadores oligo(dT) 12-18 (Invitrogen, 500 µg/ml), 2 µl DTT (Invitrogen 0,1 M), dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP e dTTP, 10 mM cada;

Invitrogen, Camarillo, CA), tampão (first strand buffer) e 200 U da enzima M-MLV transcriptase reversa (Invitrogen, EUA), a 37° C durante cinquenta minutos. O cDNA produzido foi utilizado para PCR em tempo real (qPCR-RT) em uma solução de reação com 10 µl (5 µl de Master Mix, Affymetrix, produtos USB, EUA) com o gene da sequência de DNA específico (Elim, 10 pM/µl). A PCR foi realizada usando um sistema de detecção de PCR em tempo real CFX96 (Bio-Rad, EUA) por 39 ciclos (a 95° C por 3 min, 95° C por 10 s, 30 s a [62° C para TNF- α , 60° C para IL-1 β , 59° C para IL-6, e 60° C para GAPDH], e 5 s a 65° C) (Tabela 1). A expressão relativa de ambos os genes foi normalizada em relação ao gene de controle Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A expressão relativa foi calculada usando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (ROQUE et al., 2016).

Tabela 1. Sequências de primer usadas para análise qPCR-RT do mRNA.

Gene (número de acesso)	Primer	Sequência (5'-3')
TNF-α (NM_12675.3)	Forward	TGGCGTGTTTCATCCGTTCTCTACC
	Reverse	CCCGCAATCCAGGCCACTACTT
IL-1β (NM_031512.2)	Forward	TGAGGCTGACAGACCCCAAAGAT
	Reverse	GCTCCACGGGCAAGACATAGGTAG
IL-6 (NM_012589.2)	Forward	AGCCACTGCCTTCCCTACTTCA
	Reverse	GCCATTGCACAACCTCTTTTCTCA
GAPDH (NC_005103.4)	Forward	CACGGCAAGTTCAACGGCACAGT
	Reverse	TCAGCGGAAGGGGCGGAGAT

Fonte: Roque et al., 2016.

5.6.3 Análises exclusivas para o experimento 2 (PC e exercício resistido)

Eutanásia e coleta das amostras - No 61º dia de vida pós-natal, os animais foram eutanasiados por decapitação, 48h após a última sessão de treinamento. Em seguida, removemos os músculos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) de ambos os membros para análise histológica e molecular. Os músculos gastrocnêmio e tibial anterior foram retirados para a obtenção dos dados de peso úmido e peso seco (após secagem por 72h a 60°C) e conseqüentemente da massa muscular utilizando a fórmula “mg/mm comprimento da tibia” (MARZUCA-NASSR et al., 2019). Para as

análises da expressão das proteínas de síntese proteica, os músculos foram retirados e armazenados a -80°C .

Análise da expressão das proteínas de síntese proteica – Os músculos sóleo e EDL foram homogeneizados 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 10 mM Aprotinina 0,01mg/ml). Triton X-100 1% foi acrescentado ao homogenato e em seguida foi centrifugado a 15000RPM (g) durante 20min em temperatura de 4°C . Após centrifugação, todo o sobrenadante foi separado e utilizamos apenas 2 μL para a dosagem do conteúdo total de proteínas utilizando o método proposto por Bradford (1976). 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: 1,0 mg/mL; 0,5 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,125 mg/mL; 0,0625 mg/mL. A determinação da quantidade das proteínas relacionadas à via de síntese proteica miofibrilar conforme a técnica de Western Blotting foi feita com anticorpo para proteína total e fosforilada. Após avaliação do conteúdo de proteínas de cada amostra, 20 μg de proteínas totais por slot do gel foram separadas por eletroforese de acordo com seu peso molecular, utilizando gel poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), a 50 volts por 20 minutos e 100 volts até a separação total ($\sim 1,5\text{h}$). Feita essa separação, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BIORAD®) a 80 volts por 1 hora e 40 minutos (2x 50 min). Ligações inespecíficas dos anticorpos foram inibidas incubando a membrana 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), sob agitação constante após a adição dos anticorpos primários (Rabbit Cell Signaling: S6 Ribosomal Protein [5G10] #2217; Akt #9272; Phospho-S6 Ribosomal Protein [Ser240/244] #2215; Phospho-Akt [Ser473] #9271) diluído na solução de bloqueio na proporção de 1:1000. Ao final desse período de incubação, as membranas foram lavadas em T-TBS 3 vezes, por 10 minutos cada, e incubadas com anticorpo secundário (Anti-rabbit IgG HPR-linked Antibody #7074, Cell Signaling) na proporção

de 1:5000 durante 2 horas. 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 contendo peroxidase (Tris 1M pH 8,5, luminol 250 mM, ácido p-cumárico 90 mM, 30% peróxido de hidrogênio) por 1 minuto e imediatamente seguido de leitura através do fotodocumentador (ChemiDoc XRS+). A membrana foi revelada e as intensidades das bandas foram quantificadas com o auxílio do software ImageLab (5.2.1 BIO-RAD). A membrana corada com o vermelho de Ponceau foi utilizada como o constitutivo.

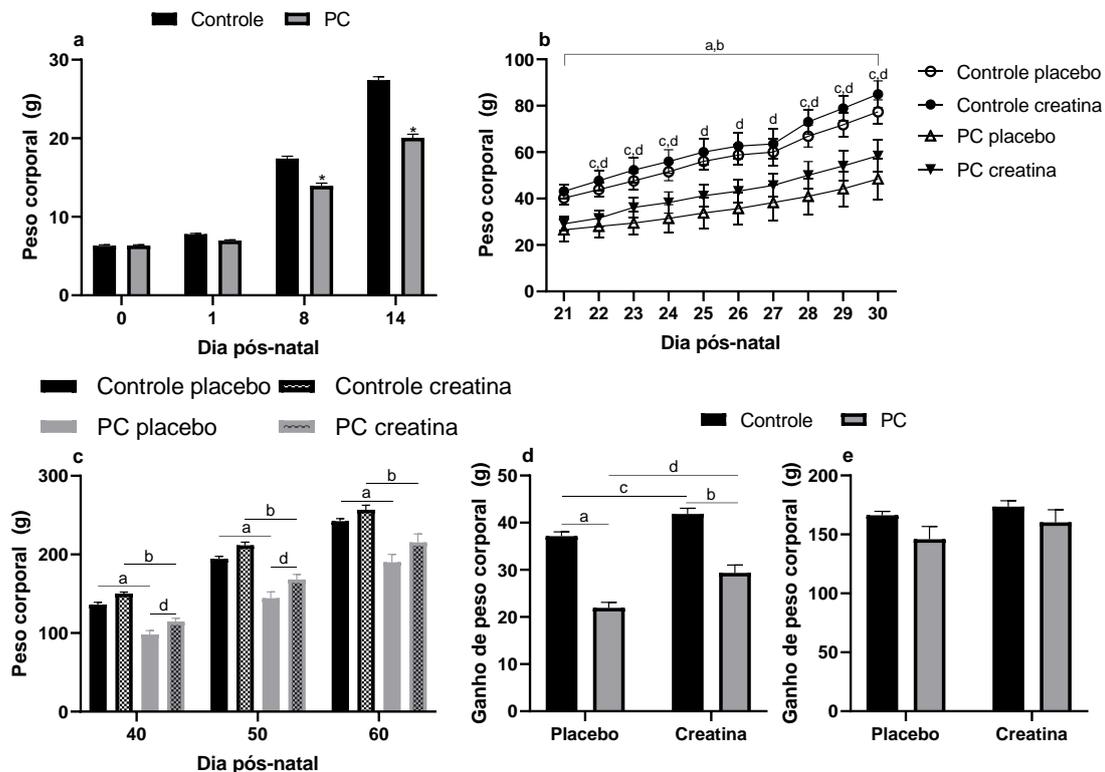
Análise Estatística - Os dados obtidos foram primeiramente analisados para distribuição normal (teste Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk). Diferenças significativas foram avaliadas utilizando o teste t não pareado ou teste ANOVA two-way seguido pelo teste post-hoc de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, e o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). O software GraphPad Prism (versão 8.4.3) foi utilizado para análise de dados.

6 RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO 1

O efeito precoce do modelo PC no peso corporal foi avaliado no P0, P1, P8, e P14. Redução significativa [$F(1,78) = 112,1; p < 0,0001$] foi encontrada no 8º e no 14º dia pós-natal quando comparado ao controle (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,0001$; Fig. 4A). Os animais de ambos os grupos PC apresentaram redução no peso corporal [$F(1,76) = 287,0; p < 0,0001$] do 21º dia até o 60º dia quando comparado aos controles (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,0001$; Fig. 4B e C). Além disso, os animais em ambos os grupos PC apresentaram menor ganho de peso total [$F(1,76) = 119,7; p < 0,0001$] entre os dias 21 e 30 quando comparado aos controles (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,0001$; Fig. 4D e E). O peso corporal, por outro lado, foi recuperado a partir da suplementação com creatina nos animais controle e PC [$F(1,76) = 17,74; p < 0,0001$]. Entre os animais controle, os que receberam Cr apresentaram aumento significativo em relação aos que receberam veículo nos dias 22, 23, 24, 28, 29 e 30, o que também se traduziu em maior ganho de peso total [$F(1,76) = 23,03; p < 0,0001$] (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,05$; Fig. 4B e D). O peso corporal também foi significativamente maior nos animais PC que receberam Cr quando comparado aos que receberam veículo em curto e longo prazo do dia 22 ao dia 50, com maior ganho de peso total entre os dias 21 e 30 [$F(1,76) = 23,03; p < 0,0001$] (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,05$; Fig. 4B e C).

Figura 4. Efeitos da PC e Cr sobre o peso corporal no período pós-natal.

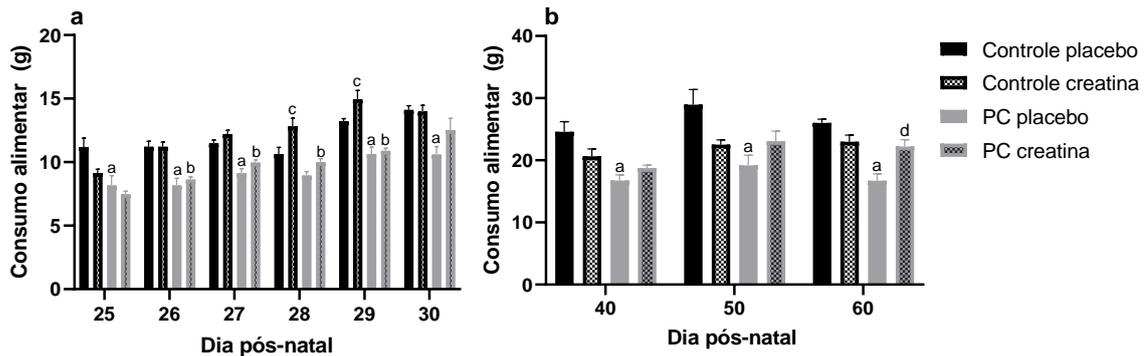


Fonte: o autor, 2022. (a) PC nos dias 0, 1, 8 e 14 da vida pós-natal ($n = 44$). (b) Peso corporal e (d) ganho de peso nos dias 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 30 ($n = 22$). Peso corporal nos dias (c) 40, 50, e 60, e (e) ganho de peso entre os dias 30 e 60 ($n = 11$). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA two-way medidas repetidas e múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey. Controle vs PC: * $p < 0,05$; Controle placebo vs PC placebo: ^a $p < 0,05$; Controle creatina vs PC creatina: ^b $p < 0,05$; Controle placebo vs Controle creatina: ^c $p < 0,05$; PC placebo vs PC creatina: ^d $p < 0,05$.

Com relação ao consumo alimentar, encontramos uma redução significativa causada pela PC quando comparado ao controle [$F(1,60) = 17,93$; $p < 0,0001$] nos dias 25, 26, 27, 29, 30, 40, 50 e 60 entre os animais que receberam veículo (Teste post-hoc de Tukey: $p < 0,01$; Fig. 5). Entre os animais PC e controle que receberam creatina, observamos redução significativa [$F(1,60) = 46,75$; $p < 0,0001$] nos dias 26, 27, 28 e 29 (Teste post-hoc de Tukey: $p < 0,001$; Fig. 5). Houve aumento do consumo [$F(1,60) = 11,97$; $p < 0,001$] induzido por Cr nos animais controle quando comparado aos que receberam veículo nos P28 e 29 (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,01$; Fig. 5) e nos animais PC que receberam creatina quando comparado aos que receberam veículo [$F(1,28) = 1,512$; $p = 0,229$] somente no P60 (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,01$; Fig. 5). Adicionalmente, o consumo de Cr em água não apresentou diferença entre os grupos

e todos receberam o mínimo planejado de 300 mg/kg/dia (valores em g/kg/dia - P30: Controle: $0,44g \pm 0,05g$ vs PC: $0,50g \pm 0,12g$; P40: Controle: $0,43g \pm 0,06g$ vs PC: $0,44g \pm 0,07g$; P50: Controle: $0,38g \pm 0,03g$ vs PC: $0,36g \pm 0,06g$; P60: Controle: $0,36g \pm 0,05g$ vs PC: $0,31g \pm 0,03g$; Teste post-hoc de Tukey: n.s.)

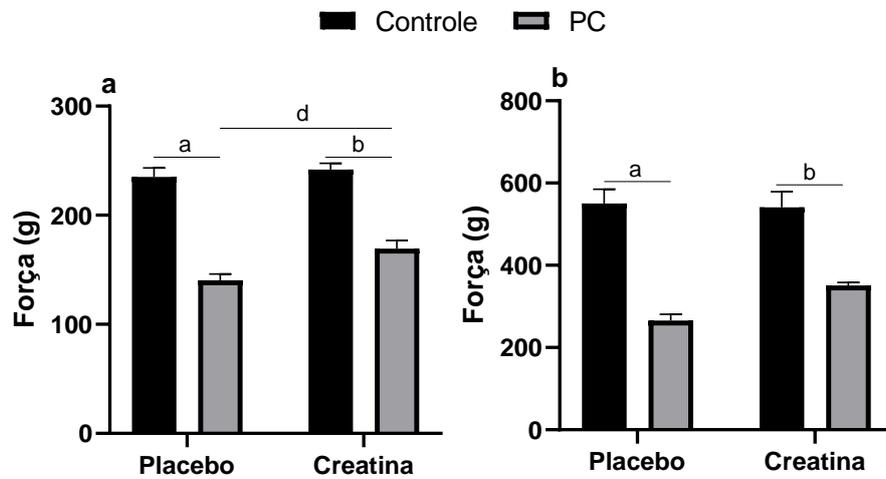
Figura 5. Efeitos da PC e Cr no consumo alimentar no período pós-natal.



Fonte: o autor, 2022. (a) Consumo alimentar nos dias 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, e 30 ($n = 16$). (b) Consumo alimentar nos dias 40, 50 e 60 ($n = 8$). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA two-way medidas repetidas e múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey. Controle placebo vs PC placebo: ^a $p < 0,05$; Controle creatina vs PC creatina: ^b $p < 0,05$; Controle placebo vs PC creatina: ^c $p < 0,05$; PC placebo vs PC creatina: ^d $p < 0,05$.

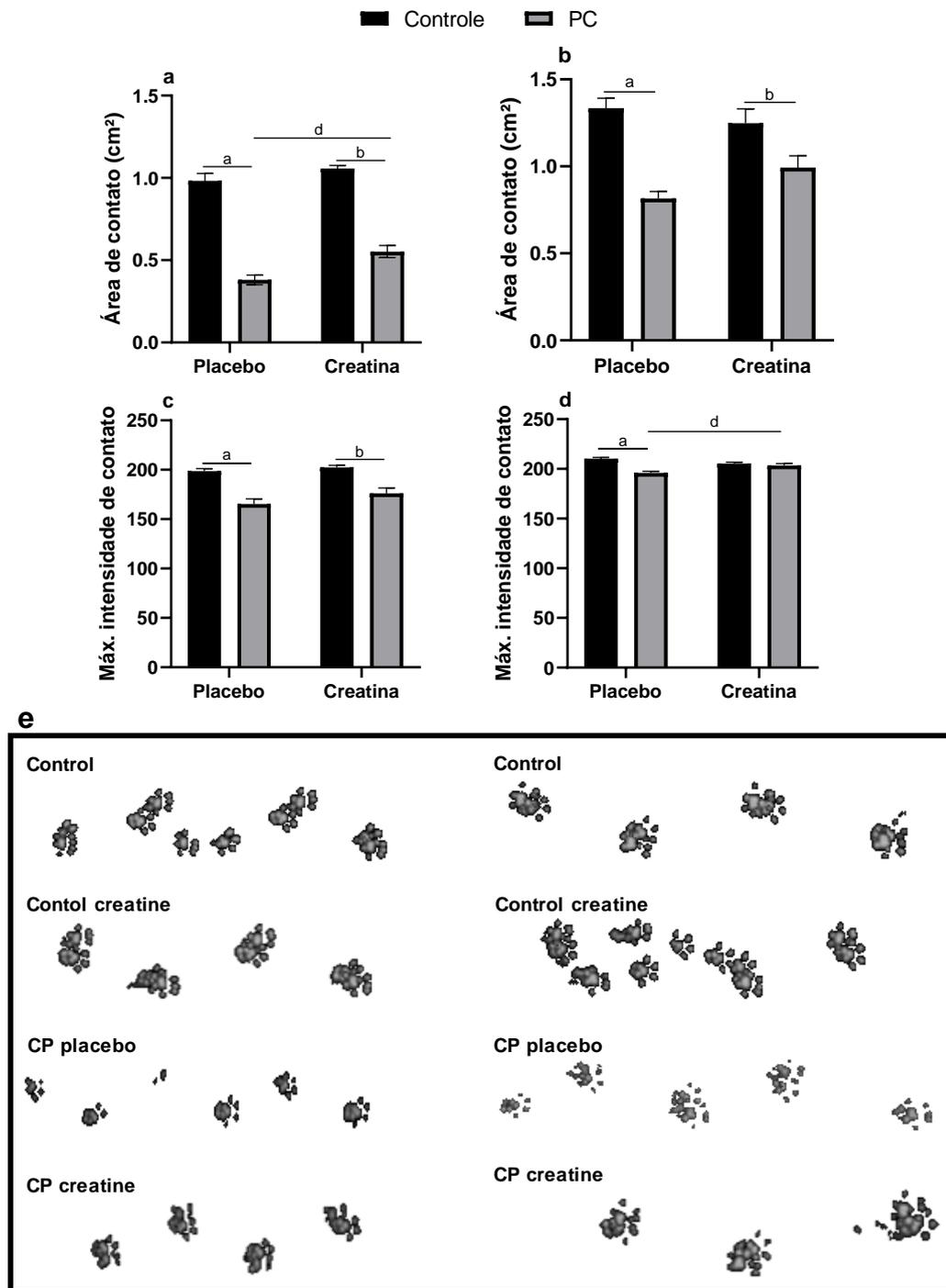
Os animais de ambos os grupos de PC apresentaram redução na força quando comparado aos controles [$F(1,52) = 145,4$; $p < 0,0001$] a curto e longo prazo (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,0001$; Fig. 6A e B), enquanto a suplementação de Cr causou aumento da força [$F(1,52) = 6,700$; $p < 0,05$] em curto prazo nos animais PC quando comparado aos que receberam veículo (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,05$; Fig. 6A). Os animais em ambos os grupos PC apresentaram uma redução significativa na área máxima de contato [$F(1,60) = 269,1$; $p < 0,0001$] e na intensidade de contato com a plataforma CatWalk [$F(1,60) = 52,69$; $p < 0,0001$] em curto e longo prazo quando comparado aos controles (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,001$; Fig. 7A, B, C, e D). A suplementação de Cr aumentou a área máxima de contato [$F(1,60) = 13,39$; $p < 0,001$] em curto prazo e a intensidade máxima de contato [$F(1,28) = 16,64$; $p < 0,001$] em longo prazo nos animais PC quando comparados aos que receberam veículo (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,01$; Fig. 7A e D).

Figura 6. Efeitos da PC e Cr sobre a força no período pós-natal.



Fonte: o autor, 2022. Força em P30 (a) (n = 14), e P60 (b) (n = 7). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA two-way múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey. Controle placebo vs PC placebo: ^ap<0,05; Controle creatina vs PC creatina: ^bp<0,05; PC placebo vs PC creatina: ^dp<0,05.

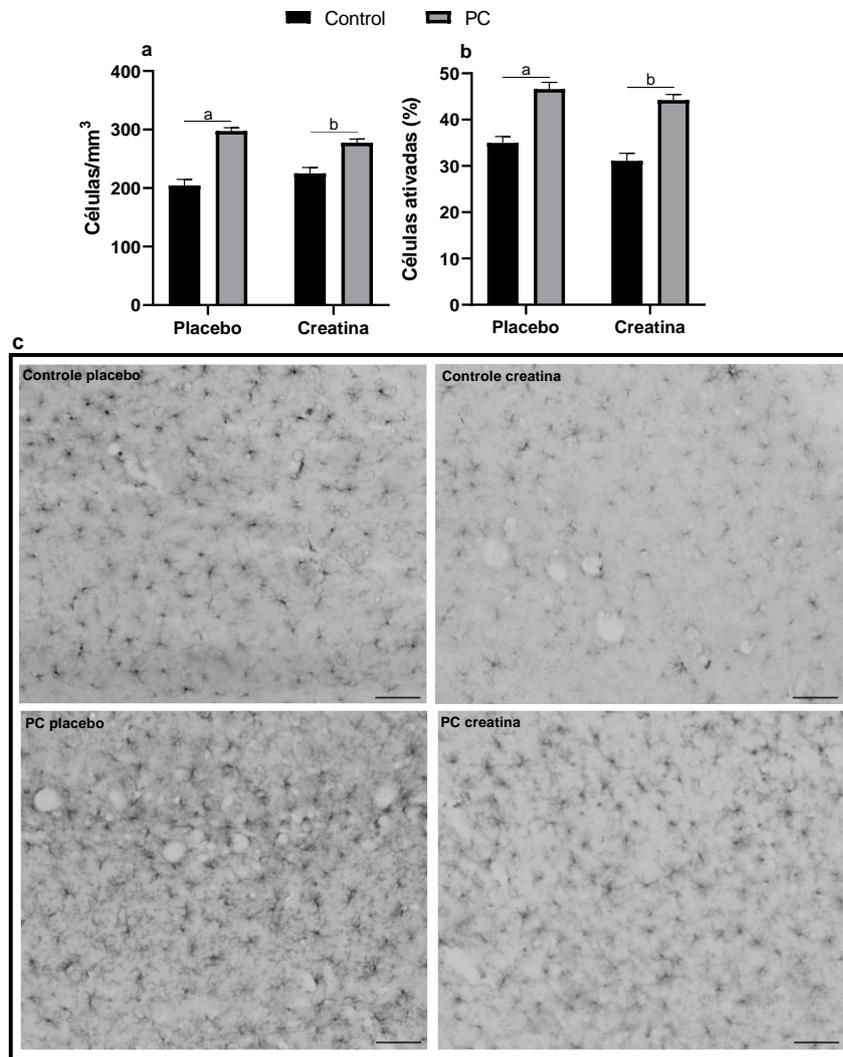
Figura 7. Efeitos da PC e Cr na área de contato e intensidade do contato com a plataforma CatWalk no período pós-natal.



Fonte: o autor, 2022. Área máxima de contato (a) e intensidade de contato (c) em P30 (n = 16). Área máxima de contato (b) e intensidade de contato (d) no P60 (n = 8). (e) Imagens representativas. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA two-way múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey. Controle placebo vs PC placebo: ^ap<0,05; Controle creatina vs PC creatina: ^bp<0,05; PC placebo vs PC creatina: ^dp<0,05.

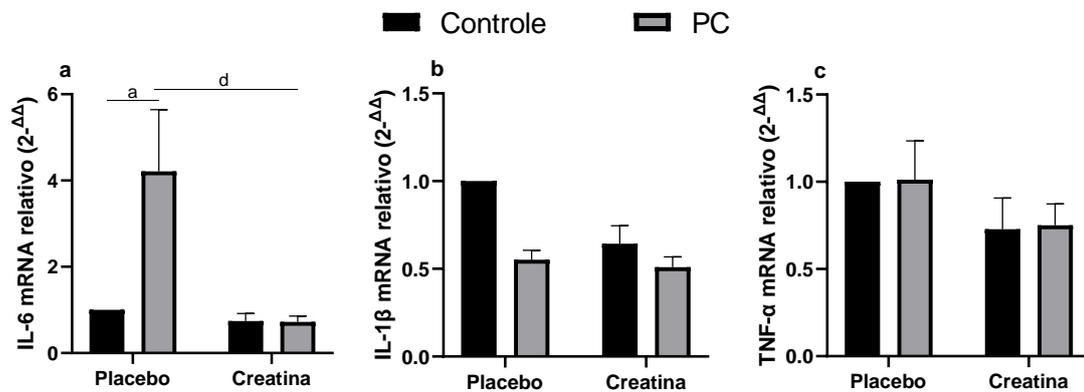
Com relação às análises no hipocampo, verificou-se que a PC ocasionou aumento significativo [$F(1,96) = 76,28$; $p < 0,001$] em ambos os grupos no número de células microgliais no hilo hipocampal quando comparados aos grupos controles (teste post-hoc: $p < 0,0001$; Fig. 8A). Além disso, a avaliação morfológica indicou uma mudança significativa nas células microgliais para um status ativado nos animais PC quando comparados aos animais controles [$F(1,96) = 74,42$; $p < 0,0001$] (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,0001$; Fig. 8B). A suplementação de Cr não ocasionou alterações na densidade [$F(1,96) = 0,002756$; p:n.s.] ou na porcentagem de ativação [$F(1,96) = 4,767$; p:n.s.] (Fig. 8A e B). Além disso, a PC ocasionou aumento da expressão da IL-6 no hipocampo quando comparado ao controle entre os animais que receberam veículo [$F(1,20) = 4,876$; $p = 0,03$] (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,05$; Fig. 9A), mas não alterou as concentrações de IL-1 β e TNF- α (Fig. 9B e C). Por outro lado, a suplementação de Cr ocasionou uma redução de magnitude semelhante na mesma IL-6 nos animais PC quando comparado aos animais que receberam veículo [$F(1,20) = 6,706$; $p < 0,05$] (teste post-hoc de Tukey: $p < 0,05$; Fig. 9A).

Figura 8. Efeitos da PC e Cr na densidade e alterações morfológicas das células microgliais no período pós-natal.



Fonte: o autor, 2022. (a) densidade celular, (b) porcentagem de células ativadas, e (c) microfotografias das células microgliais (20 x ampliação, barra de escala = 100 μ m) (n = 5). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA two-way múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey. Controle placebo vs PC placebo: ^ap<0,05; Controle creatina vs PC creatina: ^bp<0,05.

Figura 9. Efeitos da PC e Cr na expressão de citocinas pró-inflamatórias no período pós-natal.



Fonte: o autor, 2022. (a) IL-6, (b) IL-1 β , e (c) TNF- α (n = 6). Valores expressos como média \pm erro padrão de média. ANOVA two-way múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey. Controle placebo vs PC placebo: ^ap<0,05; PC placebo vs PC creatina: ^dp<0,05.

6.2 EXPERIMENTO 2

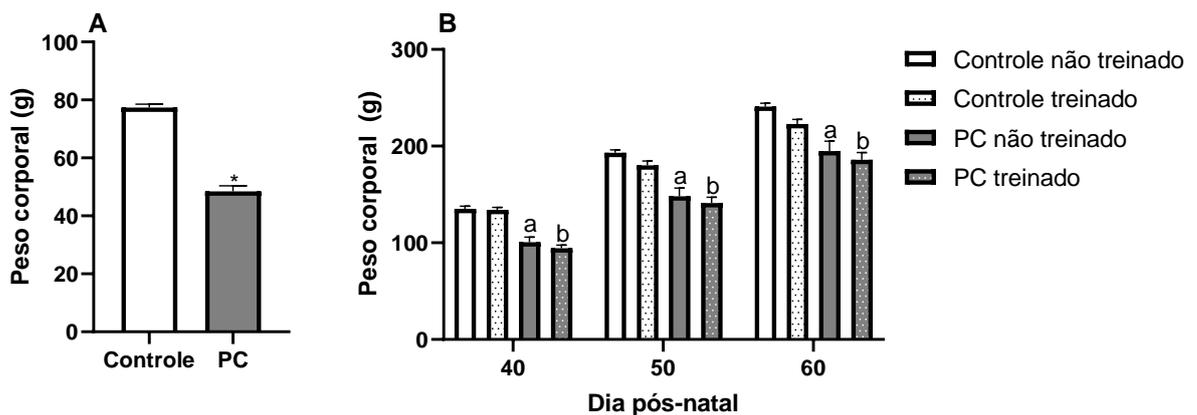
Durante as 4 semanas de treinamento observamos que os animais com PC apresentaram menor capacidade para progredir as cargas na semana 0 (sobrecarga) e nas semanas 2, 3 e 4, além de necessitar de um tempo maior para realizar as séries na semana 2 quando comparado com os animais controles treinados (teste post-hoc de Tukey: p<0.05; Tabela 2). Avaliando o peso corporal e consumo alimentar no P30, antes do início propriamente dito do programa de exercício resistido, os animais com PC apresentaram redução significativa tanto do peso corporal (p<0.0001; Fig. 10A) quanto do consumo alimentar quando comparado ao controle (p<0.0001; Fig 11A). Durante o período de treinamento, os animais de ambos os grupos PC apresentaram redução do peso corporal [F (1,40) = 104,4; p<0.0001] nos dias 40, 50 e 60 de vida pós-natal quando comparados aos animais controles (teste post-hoc de Tukey: p<0.0001; Fig. 10B). Houve redução no consumo alimentar [F (1,28) = 9,392; p=0.0048] nos animais PC não treinados quando comparados ao respectivo controle nos dias 40, 50 e 60 (teste post-hoc de Tukey: p<0.05; Fig. 11B). Com relação ao exercício, houve redução do consumo [F (1,28) = 4,245; p<0.05] nos animais controles treinados quando comparados aos controles não treinados no dia 60 (teste post-hoc de Tukey: p<0.001; Fig. 11B). Não houve efeito do exercício resistido em ambos os parâmetros nos animais PC (Figuras 10B e 11B).

Tabela 2. Progressão de carga durante o exercício resistido durante as 4 semanas de treinamento.

Período	Grupos			
	Controle		PC	
	Carga (g)	Tempo (s)	Carga (g)	Tempo (s)
Sobrecarga	289.8 ± 43.0	8.0 ± 2.9	217.9 ± 39.8*	10.2 ± 4.3
Semana 1	179.1 ± 18.9	8.4 ± 2.5	125.2 ± 27.2	13.7 ± 9.0
Semana 2	292.3 ± 55.1	6.9 ± 2.0	208.6 ± 44.4*	12.0 ± 4.8*
Semana 3	391.0 ± 84.2	10.2 ± 7.9	291.8 ± 66.9*	9.1 ± 4.2
Semana 4	470.6 ± 84.5	6.2 ± 2.4	370.8 ± 80.7*	8.6 ± 3.0

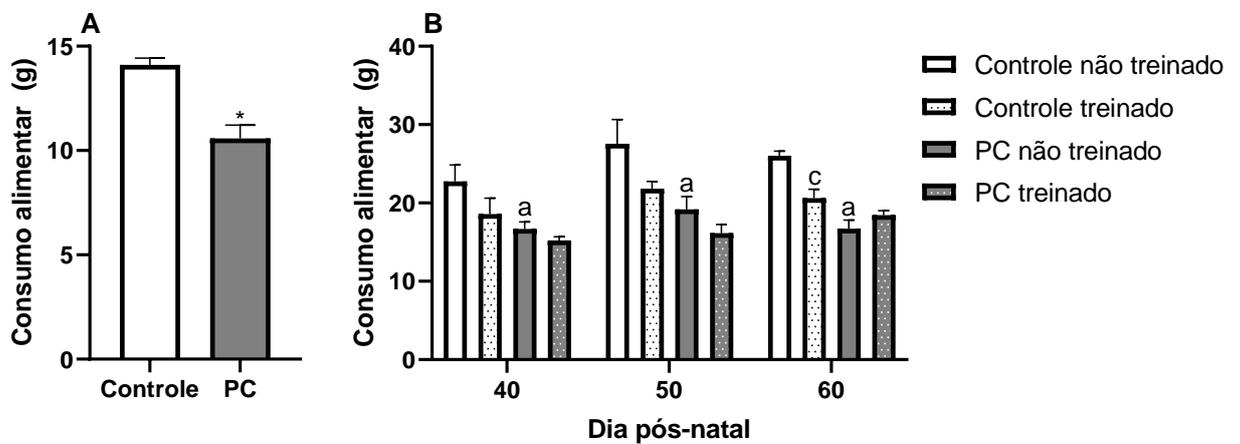
Fonte: o autor, 2022. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. ANOVA two-way medidas repetidas seguidas pelo teste post-hoc de Tukey. Controle vs CP: * $p < 0,05$.

Figura 10. Efeitos da PC e exercício resistido sobre o peso corporal no período pós-natal.



Fonte: o autor, 2022. (A) Peso corporal no dia 30 de vida pós-natal ($n = 22$). (B) Peso corporal nos dias 40, 50 e 60 de vida pós-natal ($n = 11$). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Teste t não pareado para análises no dia 30 e ANOVA two-way medidas repetidas e múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey para as análises nos dias 40, 50 e 60. Controle vs PC: * $p < 0,05$; Controle não treinado vs PC não treinado: ^a $p < 0,05$; Controle treinado vs PC treinado: ^b $p < 0,05$.

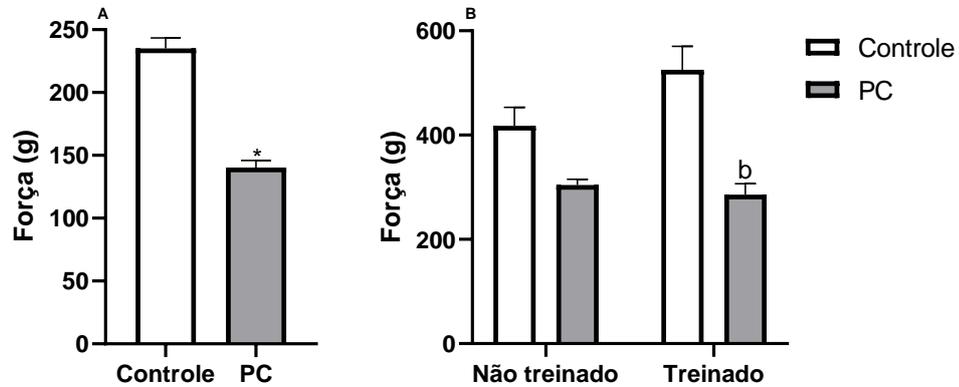
Figura 11. Efeitos da PC e exercício resistido sobre o consumo alimentar no período pós-natal.



Fonte: o autor, 2022. (A) Consumo alimentar no dia 30 de vida pós-natal ($n = 16$). (B) Peso corporal nos dias 40, 50 e 60 de vida pós-natal ($n = 8$). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Teste t não pareado para análises no dia 30 e ANOVA two-way medidas repetidas e múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey para as análises nos dias 40, 50 e 60. Controle vs PC: * $p < 0,05$; Controle placebo vs PC placebo: ^a $p < 0,05$; Controle treinado vs PC treinado: ^b $p < 0,05$; Controle não treinado vs Controle treinado: ^c $p < 0,05$.

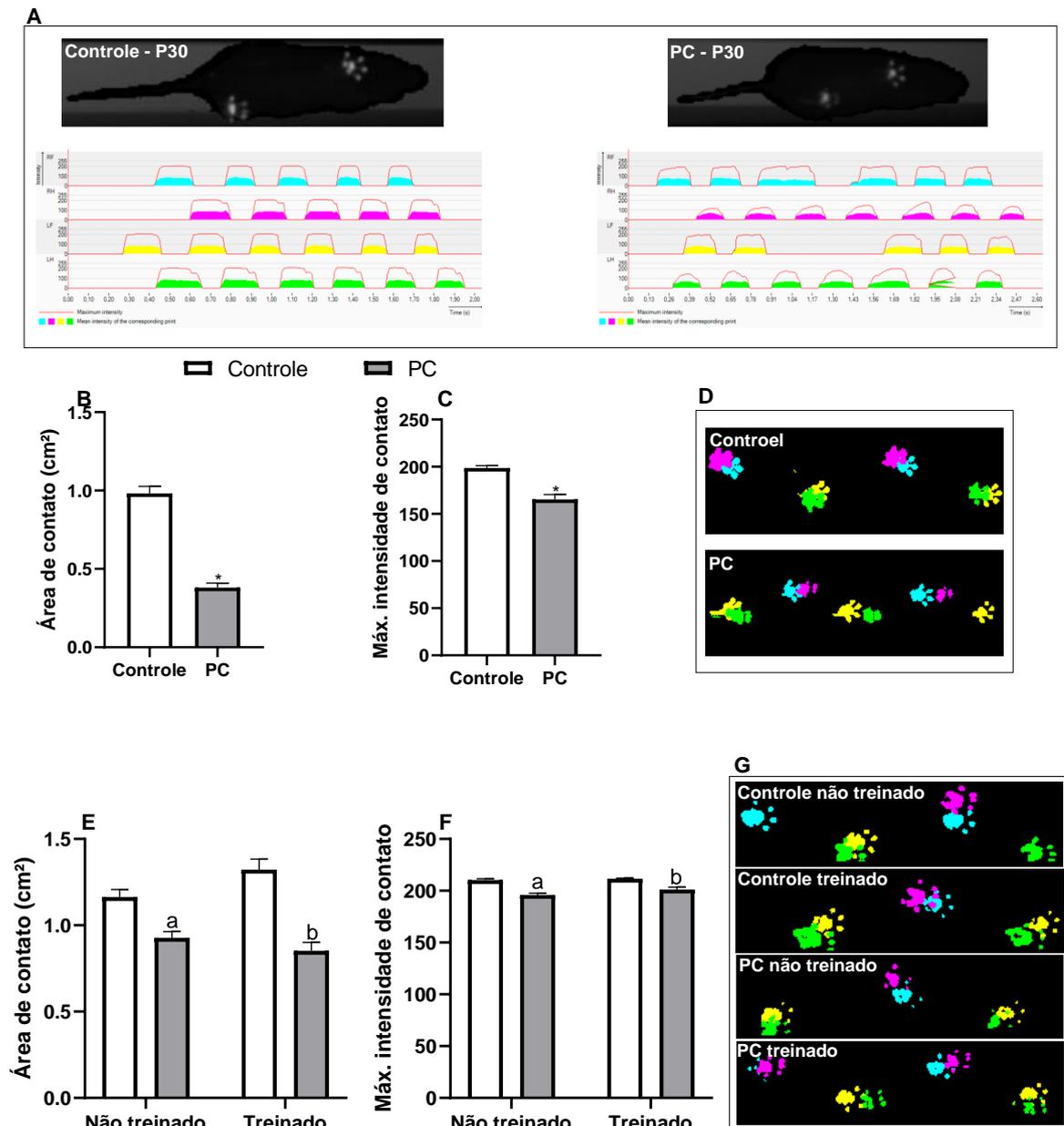
Com relação à força muscular e aos parâmetros de locomoção no CatWalk, houve redução significativa ocasionada pela PC antes do treinamento tanto na força ($p < 0.0001$; Fig. 12A) quanto na área máxima de contato e intensidade de contato com a plataforma quando comparado ao controle ($p < 0.0001$; Fig. 13B e C). Após o término do treinamento houve redução na força muscular [$F(1,24) = 32.42$; $p < 0.0001$] nos animais PC treinados quando comparados com os respectivos controles (teste post-hoc de Tukey: $p < 0.0001$; Fig. 12B), além de redução da área máxima de contato [$F(1,28) = 53.27$; $p < 0.0001$] e intensidade de contato com a plataforma [$F(1,28) = 61.80$; $p < 0.0001$] nos animais PC de ambos os grupos quando comparados aos controles (teste post-hoc de Tukey: $p < 0.05$; Fig. 13E e F). Novamente, não houve efeito do exercício resistido em nenhum dos parâmetros (Fig. 12B e 13B).

Figura 12. Efeitos da PC e exercício resistido sobre a força muscular no período pós-natal.



Fonte: o autor, 2022. (A) Força muscular no dia 30 de vida pós-natal (n = 14). (B) Peso corporal no dia 60 de vida pós-natal (n = 7). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Teste t não pareado para análises no dia 30 e ANOVA two-way medidas repetidas e múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey para as análises nos dias 40, 50 e 60. Controle vs PC: * $p < 0,05$; Controle treinado vs Pc treinado: ^b $p < 0,05$.

Figura 13. Efeitos da PC e exercício resistido sobre a área de contato e intensidade do contato com a plataforma CatWalk no período pós-natal.



Fonte: o autor, 2022. (A) imagens representativas. Área máxima de contato (B) e intensidade de contato (C) no P30 ($n = 16$) e P60 (E e F) ($n = 8$). Teste t não pareado para análises no dia 30 e ANOVA two-way e múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey para as análises nos dias 40, 50 e 60. Controle vs PC: $*p < 0,05$; Controle não treinado vs PC não treinado: $^ap < 0,05$; Controle treinado vs PC treinado: $^bp < 0,05$.

Em relação aos músculos das patas posteriores e à tibia, os animais PC treinados apresentaram redução do peso do músculo sóleo [F (1.20) = 30.35; $p < 0.0001$], do EDL [F (1.20) = 22.71; $p < 0.0001$], do gastrocnêmio úmido [F (1.20) = 20.26; $p < 0.001$] e seco [F (1.20) = 10.70; $p < 0.05$], além do comprimento da tibia [F (1.20) = 33.24; $p < 0.0001$] quando comparados aos controles treinados, evidenciando o efeito negativo da PC (teste post-hoc de Tukey: $p < 0.05$; Tabela 3). Nos animais PC treinados houve redução no peso do EDL [F (1.20) = 8.965; $p < 0.05$] e do comprimento da tibia [F (1.20) = 5.594; $p < 0.05$] quando comparados aos animais PC que não treinaram, o que sugere que os parâmetros do exercício resistido podem não ter sido adequados para os animais com PC (teste post-hoc de Tukey: $p < 0.05$; Tabela 3). Com relação às proteínas de síntese proteica, observamos redução apenas na Akt total [F (1.20) = 10.45; $p < 0.05$] nos animais PC não treinados em comparação aos controles não treinados no músculo sóleo (Teste post-hoc de Tukey: $p < 0.05$; Fig. 14B). Não foram observadas diferenças significantes na expressão das proteínas no músculo EDL (Fig. 15).

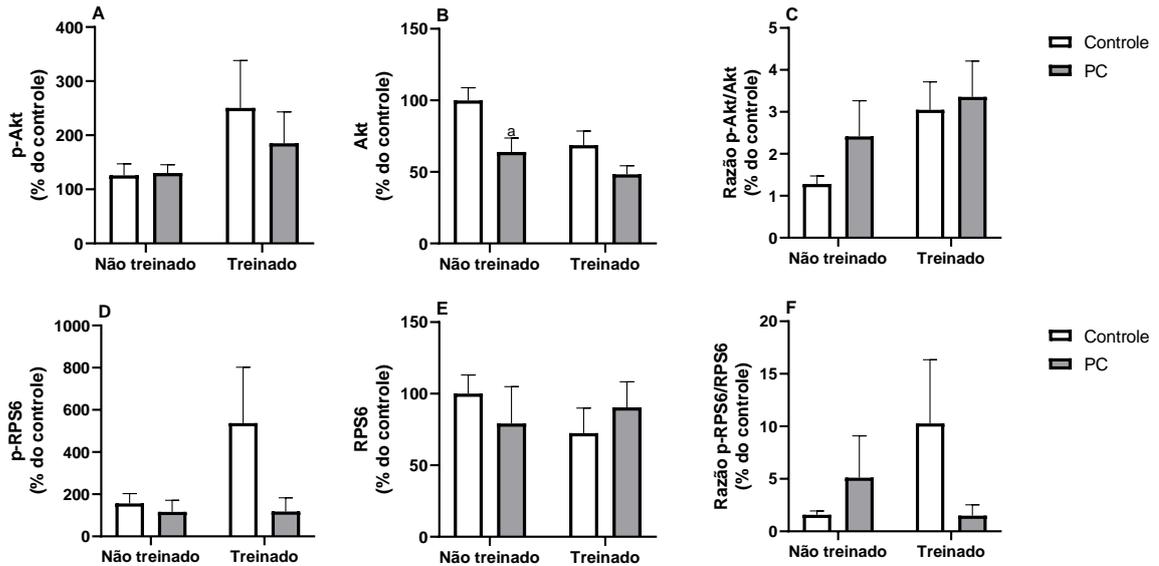
Tabela 3. Peso e massa magra dos músculos das patas posteriores e comprimento da tibia.

Parâmetro	Grupos			
	Controle não treinado	Controle treinado	PC não treinado	PC treinado
Sóleo (g)	0.102 ± 0.005	0.102 ± 0.007	0.084 ± 0.021	0.065 ± 0.010 ^b
Efeito da PC			↓ 17.6%	↓ 36.2%
Efeito do treinamento		0.0%		↓ 22.6%
EDL (g)	0.108 ± 0.007	0.104 ± 0.004	0.095 ± 0.017	0.071 ± 0.013 ^{b,d}
Efeito da PC			↓ 12.0%	↓ 31.7%
Efeito do treinamento		↓ 3.7%		↓ 25.2%
Tibia (mm)	31.577 ± 0.812	31.400 ± 0.084	30.167 ± 1.004	28.082 ± 1.506 ^{b,d}
Efeito da PC			↓ 4.4%	↓ 10.5%
Efeito do treinamento		↓ 0.5%		↓ 6.9%
Gastrocnêmio				
Peso úmido (mg/mm tibia)	0.042 ± 0.003	0.042 ± 0.004	0.036 ± 0.007	0.030 ± 0.005 ^b
Efeito da PC			↓ 14.2%	↓ 28.5%
Efeito do treinamento		0.0%		↓ 16.6%
Peso seco (mg/mm tibia)	0.011 ± 0.001	0.011 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.007 ± 0.002 ^b
Efeito da PC			↓ 9.0%	↓ 36.3%
Efeito do treinamento		0.0%		↓ 30.0%
Tibial anterior				
Peso úmido (mg/mm tibia)	0.009 ± 0.002	0.008 ± 0.004	0.006 ± 0.002	0.007 ± 0.002
Efeito da PC			↓ 33.3%	↓ 12.5%
Efeito do treinamento		↓ 11.1%		↑ 16.6%

Peso seco (mg/mm tíbia)	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001	0.002 ± 0.001
Efeito da PC			0.0%	0.0%
Efeito do treinamento		0.0%		0%

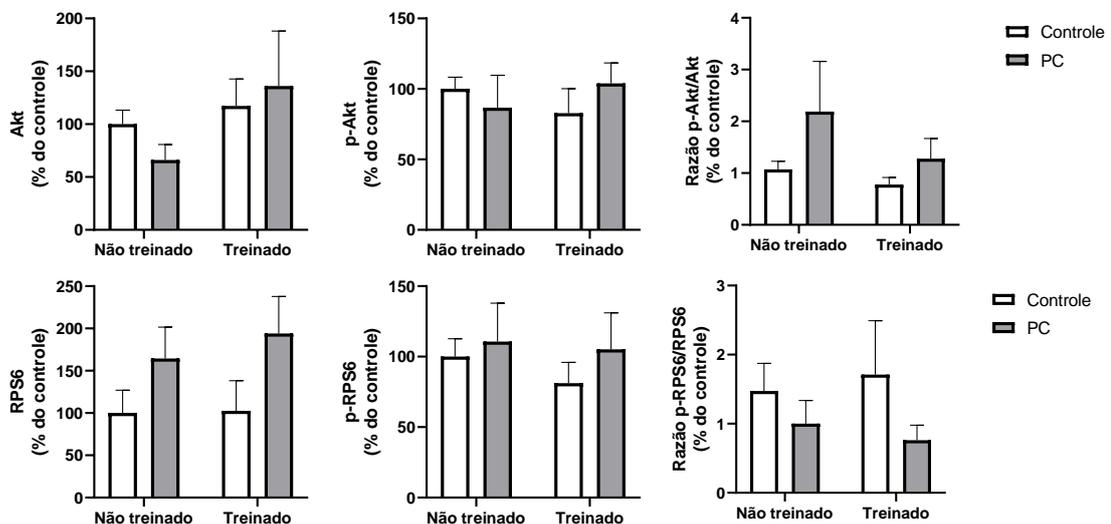
Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. ANOVA two-way e múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey. Controle treinado vs Pc treinado: ^bp<0,05; PC treinado vs PC não treinado: ^dp<0.05.

Figura 14. Efeitos da PC e do exercício resistido na sinalização da via Akt-mTOR no músculo sóleo determinados por Western blotting.



Fonte: o autor, 2022. (A) p-Akt, (B) Akt, (C) razão p-akt/akt, (D) p-RPS6, (E) RPS6 e (F) razão p-RPS6/RPS6 (n = 6). Valores expressos em média ± erro padrão da média. Two-Way ANOVA e múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey. Controle não treinado vs PC não treinado: ^ap<0,05.

Figura 15. Efeitos da PC e do exercício resistido na sinalização da via Akt-mTOR no músculo EDL determinados por Western blotting.



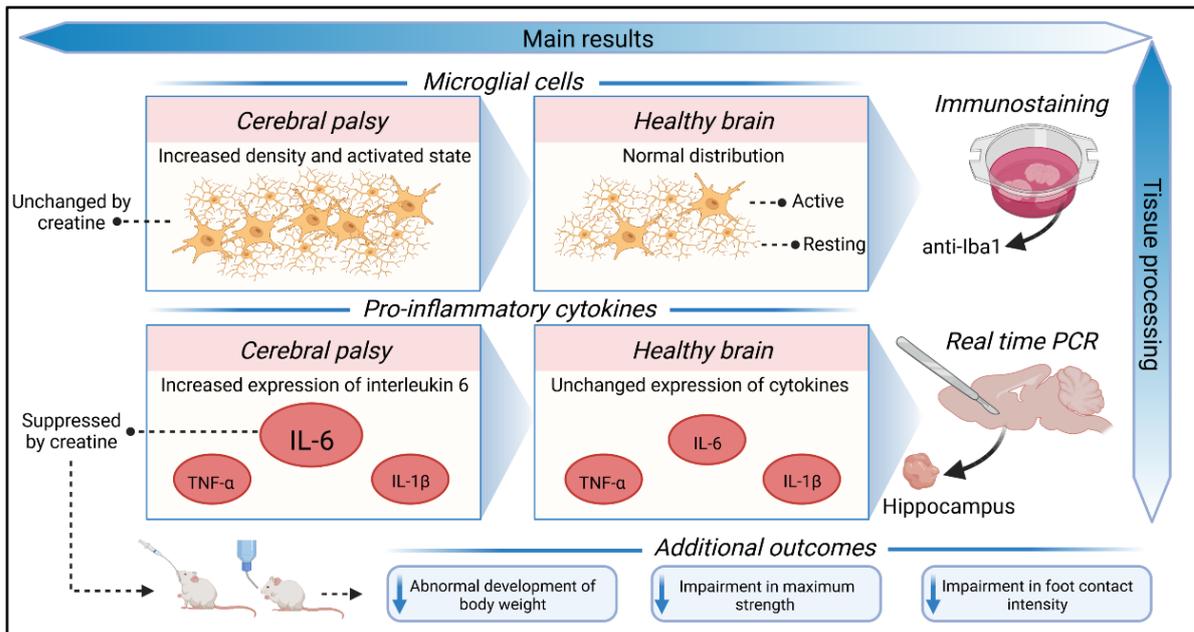
Fonte: o autor, 2022. (A) Akt, (B) p-Akt, (C) razão p-akt/akt, (D) RPS6, (E) p-RPS6 e (F) razão p-RPS6/RPS6 (n = 6). Valores expressos em média \pm erro padrão da média. Two-Way ANOVA e múltiplas comparações do teste post-hoc de Tukey.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados os efeitos da PC experimental no peso corporal, consumo alimentar, força muscular, parâmetros da locomoção, densidade e porcentagem de ativação das células microgлияis, marcadores inflamatórios no hipocampo, na expressão de proteínas da via de síntese proteica e no peso e massa magra de músculos das patas posteriores. Com relação aos tratamentos, foram avaliados para ambos os experimentos com Cr e exercício resistido: peso corporal, consumo alimentar, força muscular e parâmetros da locomoção. No experimento com suplementação de Cr ainda avaliamos a densidade e porcentagem de ativação das células microgлияis, e marcadores inflamatórios no hipocampo, já no experimento com exercício resistido avaliamos a expressão de proteínas da via de síntese proteica PI3K/Akt/mTOR e o peso e massa magra de músculos das patas posteriores.

Observamos que a PC causou reduções no peso corporal, no consumo alimentar, na força muscular, na área máxima de contato e intensidade de contato durante a marcha em CatWalk em ambos os experimentos. No primeiro experimento, a PC ainda aumentou a densidade e ativação das células microgлияis e a expressão da IL-6 no hipocampo. No segundo experimento a PC também ocasionou redução significativa do peso dos músculos sóleo e EDL, do peso úmido e seco do músculo gastrocnêmio, do comprimento da tíbia e redução da expressão da proteína Akt total no músculo sóleo. A suplementação de Cr em animais PC, por sua vez, reduziu os prejuízos ao aumentar o peso corporal do P22 ao P50, a força muscular no P30, área máxima de contato no P30 e intensidade máxima do contato no P60 durante a marcha, e reduziu drasticamente a expressão de IL-6 no hipocampo (Fig. 16). Com relação ao treinamento resistido, não foram observados efeitos positivos. Por outro lado, houve redução do peso do músculo EDL e do comprimento da tíbia, o que indica um possível efeito negativo do exercício resistido nos animais com PC.

Figura 16. Ilustração esquemática dos principais resultados encontrados no experimento 1 (PC e Cr).



Fonte: o autor, 2022.

7.1 PARALISIA CEREBRAL

A PC experimental ocasionou, neste estudo, um quadro caracterizado por atraso no desenvolvimento somático associado às alterações motoras e musculares, e fraqueza dos membros anteriores em longo prazo. Com relação ao peso corporal, esses dados corroboram os achados obtidos em estudos que avaliaram o mesmo modelo experimental de PC e observaram uma redução semelhante no peso corporal (LACERDA et al., 2017b, 2019). O impacto negativo no peso corporal pode estar relacionado ao dano motor e à atrofia produzido pela restrição sensório motora (RSM) durante o desenvolvimento (DELCOUR et al., 2018a; STRATA et al., 2004). De fato, Silva et al. (2016) relataram que a redução do peso corporal foi associada com alteração em diversos parâmetros da locomoção em campo aberto, incluindo distância percorrida, velocidade, potência e energia cinética, desde a segunda semana de vida pós-natal (SILVA et al., 2016). O dano motor gerado pela RSM pode ocasionar déficits nos movimentos de sucção e mastigação e diminuir a ingestão de alimentos (LACERDA et al., 2017b). Em nosso estudo, apesar de não termos avaliado os movimentos de sucção e mastigação, observamos redução do consumo alimentar nos animais com PC. Entretanto, com relação ao consumo hídrico no presente estudo, os animais com PC não apresentaram redução significativa da ingestão de água, o que

consequentemente não prejudicou o consumo de Cr durante o período de suplementação *ad libitum* (P30-60).

É bem documentado que a restrição de membros (desuso) ocasiona atrofia na musculatura. Coq et al. (2008), utilizando RSM, observaram prejuízos motores associado à atrofia das fibras musculares, degeneração articular e do joelho, além de representação distorcida dos membros inferiores no córtex somatossensorial primário (COQ et al., 2008). Delcour et al. (2018b), por sua vez, relataram marcha e postura severamente prejudicadas, provavelmente por causa da hiperextensão do joelho-tornozelo. Os autores ainda observaram redução do comprimento e densidade do osso tibial, degeneração da articulação do joelho, atrofia do gastrocnêmico e hiperreflexia muscular sugerindo espasticidade (DELCOUR et al., 2018a). Assim como em nosso estudo, eles relataram redução da área máxima de contato durante a caminhada na plataforma um mês após a cessação da RSM, demonstrando que a restrição ocasiona desordens locomotoras persistentes (DELCOUR et al., 2018a). Em nosso estudo, também avaliamos se a atrofia pode estar relacionada à redução da síntese proteica, tendo em vista que a perda de massa muscular está principalmente relacionada a reduções na síntese proteica muscular (PHILLIPS; GLOVER; RENNIE, 2009). Encontramos redução da expressão da proteína Akt total no músculo sóleo, mas não no EDL. Estudo publicado anteriormente também relatou redução da expressão da proteína Akt total, assim como da fosforilada no músculo sóleo (VISCO et al., 2022). Em outro estudo com o mesmo modelo, os animais com PC apresentaram alteração na expressão de vários genes relacionados ao desenvolvimento muscular e junções neuromusculares, como por exemplo aumento dos níveis de mRNA de *Igfbp5*, *Kcnn3*, *Gdf8* e *MyH4* e diminuição da expressão de *Myog*, *Ucp2* e *Lpl* (PEREIRA et al., 2021).

Com relação aos efeitos centrais, observamos em nosso estudo que a PC alterou tanto a densidade de células microgliais quanto a porcentagem de células microgliais ativadas. As células microgliais estão localizadas em nichos neurogênicos e são consideradas importantes para a neurogênese e funções normais do cérebro, como resposta a insultos, que podem ocorrer de forma ineficiente após a ativação excessiva de células microgliais (EKDAHL, 2012). A ativação da micróglia, efetivamente, foi descrita como uma evidência de lesão cerebral perinatal em vários modelos experimentais (MCRAE et al., 1995; TAHRAOUI et al., 2006; TREMBLAY et al., 2017). Inúmeros estudos têm avaliado a influência de vários indutores de estresse

sobre estes parâmetros, incluindo o lipopolissacarídeo (LPS), que é utilizado para induzir a PC em animais (CHO et al., 2018; FRAGOPOULOU et al., 2019). A ativação microglial induzida por LPS causou uma diminuição significativa na sobrevivência dos neurônios recém-formados no hipocampo, que foi aumentada após o uso de um agente anti-inflamatório (MONJE et al., 2003). Outro estudo observou prejuízos na neurogênese hipocampal adulta após dano pré-natal induzido por LPS associados à excessiva ativação microglial (EKDAHL et al., 2003). Além disso, a ativação excessiva das micróglia está associada à liberação descontrolada de citocinas pró-inflamatórias, que apesar de serem consideradas importantes mediadores da neurogênese, podem ser prejudiciais em excesso (IOSIF et al., 2006; YIRMIYA; GOSHEN, 2011). Estudos realizados em camundongos encontraram mudanças nos níveis de mRNA de IL-6, TNF- α e IL-1 β no hipocampo após estresse induzido pela exposição à luz brilhante durante a gestação e/ou separação materna (DIZ-CHAVES et al., 2012; ROQUE; OCHOA-ZARZOSA; TORNER, 2016). Em humanos, estudos observaram alterações periféricas em marcadores inflamatórios em indivíduos com CP, incluindo alterações na proteína C reativa (CRP), IL-1 β , IL-6, e TNF- α , que foram associados com redução da massa muscular e com achados neurológicos anormais (MAGALHÃES et al., 2019; PINGEL et al., 2019). Entretanto, fomos os primeiros a observar os níveis destes marcadores no cérebro, mais especificamente no hipocampo, num modelo experimental de PC, e observamos aumento na expressão da IL-6, mas não na TNF- α e IL-1 β . Tendo em vista que alteração nestes marcadores pode ocasionar alterações comportamentais, incluindo alteração do comportamento alimentar e social, além de modificações fisiológicas e neurológicas, incluindo aumento da degradação proteica (CELLA et al., 2020; DANTZER, 2004), são necessários estudos com substâncias anti-inflamatórias que avaliem os benefícios centrais e periféricos. No presente estudo, avaliamos os efeitos da suplementação de Cr.

7.2 CREATINA

A suplementação de Cr ocasionou inicialmente aumento no peso corporal, na força, na área máxima de contato e intensidade de contato com a plataforma CatWalk. Aoki et al. (2004) relataram que a suplementação de Cr atenuou a perda muscular induzida por imobilização após suplementação contínua por 14 dias em ratos (5g/kg/dia)(AOKI et al., 2004). Após 14 dias de carga de Cr, o conteúdo total de Cr

nos músculos sóleo e gastrocnêmio aumentou em 25% e 18%, respectivamente, atenuando a perda muscular (AOKI et al., 2004). Os autores concluíram que este efeito pode estar associado a capacidade da Cr de induzir um efeito mitótico das células satélite, além de proteger a célula muscular esquelética da proteólise (AOKI et al., 2004). Os mesmos autores relataram que 7 dias de suplementação não foram suficientes para ocasionar os resultados observados após 14 dias (AOKI et al., 2004). Marzuca-Nassr et al. (2019), após suplementação por apenas 5 dias (5g/kg/dia), relataram leves atenuações da perda de massa dos músculos sóleo e EDL de ratos submetidos à imobilização dos membros posteriores. Além disso, a suplementação não foi capaz de atenuar a redução da CSA e diminuição da força muscular (MARZUCA-NASSR et al., 2019).

Hespel et al. (2001) relataram que a suplementação com Cr (5-20g/dia) facilitou a reabilitação da atrofia induzida por desuso a partir da regulação do fator regulador miogênico 4 (MRF4) e aumento da expressão de proteínas miogênicas (HESPEL et al., 2001). Os autores relataram aumento de mais de 10% da área das fibras musculares e mais de 25% de força máxima durante a reabilitação (HESPEL et al., 2001). Em humanos, Stout et al. (2007) encontraram uma melhora significativa na força máxima de preensão manual em adultos idosos que suplementaram com creatina (20 g/dia por 7 dias seguidos de 10 g/dia por 7 dias) em comparação com placebo (STOUT et al., 2007). Além disso, Rawson et al. (1999) mostraram que 1 mês de suplementação com creatina (20 g/dia por 10 dias seguido de 4 g/dia por 20 dias) reduziu a fadiga muscular em homens idosos (60-82 anos de idade) (RAWSON; WEHNERT; CLARKSON, 1999). Gotshalk et al. (2002 e 2007) encontraram um aumento na força e funcionalidade em adultos idosos que suplementaram com creatina (0,3 g/kg/dia) por uma semana (GOTSHALK et al., 2002, 2007). Os resultados obtidos pelo presente estudo com relação ao peso corporal, força e locomoção, podem assim ser explicados pelos efeitos da Cr sobre os músculos esqueléticos. São múltiplos os mecanismos pelos quais a Cr pode estar relacionada com o aumento de força e da massa muscular, incluindo efeito osmótico atuando como estressor celular e conseqüente estímulo anabólico, além da modulação direta de componentes da via alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR) (DELDICQUE et al., 2007; SAFDAR et al., 2008; SAKKAS; SCHAMBELAN; MULLIGAN, 2009; WALL; VAN LOON, 2013). A Cr também influenciou diretamente processos miogênicos a partir da secreção de miocinas como a miostatina e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-

1), além da alteração na expressão de fatores regulatórios miogênicos, resultando em aumento da atividade mitótica de células satélites (WILLOUGHBY; ROSENE, 2003).

Também encontramos uma associação entre o Cr e o aumento do consumo alimentar. Apesar de não estar claro os mecanismos subjacentes, um estudo em modelos animal relatou que a concentração de Cr no cérebro desempenha um papel na regulação da ingestão de alimentos e peso corporal (GALBRAITH; FURUKAWA; LI, 2006). Assim, é possível sugerir que a suplementação pode ter evitado uma redução do consumo ainda maior nos animais PC do que o observado neste estudo. No presente estudo, entretanto, a intervenção Cr não causou alterações na densidade ativação de micróglia. Embora nenhum outro estudo tenha avaliado o efeito da suplementação de Cr no perfil de micróglia, outros estudos avaliaram parâmetros associados à neurogênese. Um estudo realizado por Leem et al. (2018), após quatro semanas de estresse crônico leve, observou que diminuição do número de células Ki-67+ (um marcador de proliferação) e DCX+ (um marcador de diferenciação) no giro dentado do hipocampo foi revertida pela suplementação de Cr através da ativação da via Wnt/GSK3 β / β -catenina em camundongos (LEEM et al. 2018). Outro estudo realizado com camundongo relatou que a utilização de Cr na dieta (3%, w/w) melhorou memória espacial dependente do hipocampo, a bioenergética, e níveis de proteínas relacionadas à plasticidade neural associadas à fator nuclear kappa B (NF- κ B), como a proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), a proteína de resposta ao crescimento precoce 1 (Egr1), e a I κ B kinase (I κ B) (SNOW et al., 2018).

Além disso, observamos uma redução na expressão de IL-6 para valores semelhantes aos dos controles após a suplementação de Cr no hipocampo. Efeitos anti-inflamatórios também foram observados com a Cr em outros estudos envolvendo ratos portadores de tumor, incluindo redução da expressão de TNF- α e IL-6 no plasma (CAMPOS-FERRAZ et al., 2016; CELLA et al., 2020). Em um desses estudos, a Cr também ocasionou aumento da expressão da IL-10, e os autores sugerem que isso fornece fortes evidências de um ambiente anti-inflamatório (CAMPOS-FERRAZ et al., 2016). Em um estudo in vitro, a Cr foi capaz de suprimir a adesão de neutrófilos às células endoteliais e inibir a ligação da molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e E-selectina, sugerindo um efeito anti-inflamatório da Cr (NOMURA et al., 2003). Em um modelo de isquemia pulmonar em ratos, a suplementação de Cr reduziu a lesão pulmonar aguda através de mecanismos anti-inflamatórios que incluíram uma atenuação do receptor Toll-like 4 (TLR-4), um sinalizador para a ativação do fator

nuclear kappa B (NF- κ B) que realiza o início da resposta inflamatória inata do sistema imunológico (ALMEIDA et al., 2016). Assim, estes resultados indicam que a suplementação de Cr tem o potencial de modular marcadores de inflamação. Estudos futuros devem avaliar diferentes tipos de citocinas, tanto pró- como anti-inflamatórias, após a intervenção com Cr, incluindo IL-2, IL-8, IL-10, IL-18, TNF- β , e interferon- γ , não avaliadas no presente estudo, além de parâmetros associados à neurogênese hipocampal. Além disso, é necessário continuar avaliando o perfil de segurança para a exposição precoce à Cr em crianças com PC, tendo em vista que, com base em evidências limitadas, a Cr parece ser segura e potencialmente benéfica para crianças e adolescentes (ANTONIO et al., 2021).

7.3 EXERCÍCIO RESISTIDO

Sobre os efeitos do treinamento resistido, nenhuma influência foi observada no desenvolvimento do peso corporal, na força muscular e nos parâmetros da locomoção. Houve uma redução momentânea no consumo alimentar de animais controles e redução do peso do músculo EDL e comprimento da tibia nos animais PC treinados. Em um estudo realizado por Mônico-neto et al. (2015), os quais utilizaram treinamento resistido semelhante ao utilizado pelo nosso estudo, o ganho de peso foi maior no grupo sedentário (MONICO-NETO et al., 2015). Outros estudos não encontraram modificações no peso corporal durante e após o treinamento resistido, o que indica que os animais treinados se adaptaram ao estresse mecânico e permaneceram se desenvolvendo à medida que envelheciam (CASSILHAS et al., 2013; MURAI et al., 2015). Por outro lado, o treinamento ocasionou, dentre outros resultados, aumento do peso muscular e da área de secção transversa do músculo (MONICO-NETO et al., 2015). De forma mais específica, Cassilhas et al. (2013) relataram, após o ensaio histológico e a quantificação de fibras no gastrocnêmico, flexor longo dos dedos e plantar, aumentos de 60%, 35% e 38% de hipertrofia, respectivamente, em comparação com o grupo de controle. Os autores ainda relataram que isso pode ser resultados de ativações de diversas vias celulares, incluindo a via do IGF-1 (CASSILHAS et al., 2013).

O aumento da expressão de IGF-1 que ocorre com o treinamento de força ativa a PIK3, que fosforila posteriormente a AKT. Esta via resulta na fosforilação de mTOR e ativação de P70S6K, o que aumenta a síntese de proteínas (MCGLORY; PHILLIPS,

2015; SONG et al., 2017). Entretanto, como citado anteriormente, não observamos alterações nas proteínas de síntese proteica avaliadas (Akt e S6) relacionadas ao exercício. Apesar do treinamento resistido utilizado em nosso estudo ser semelhante aos dos estudos citados, houve diferença no período de treinamento e nos parâmetros utilizados, o que pode explicar os efeitos negativos do exercício observado no nosso estudo. Enquanto realizamos o treinamento por apenas 4 semanas, os outros dois estudos que encontraram resultados positivos realizaram por 8 semanas (CASSILHAS et al., 2013; MONICO-NETO et al., 2015). No estudo de Cassilhas et al. (2013), por exemplo, a carga de 100% relativo ao peso corporal, só foi utilizada a partir da 7ª série, enquanto que no nosso estudo e no estudo realizado por Mônico-Neto et al. (2015), a mesma carga foi utilizada a partir da 4ª série, tornando o exercício mais intenso (CASSILHAS et al., 2013; MONICO-NETO et al., 2015). Os animais utilizados por Mônico-Neto et al. (2015), entretanto, tinham 75 dias de vida no início do estudo e não apresentavam condições caracterizadas por danos motores, o que sugere que parâmetros mais intensos devem ser aplicados para animais com menos limitações que animais com PC.

Sobre os efeitos do treinamento resistido nos animais controle, observamos redução no consumo alimentar no dia 60. Broom et al. (2009), ao avaliarem a influência de uma sessão aguda de exercício aeróbico ou de resistência na percepção da fome e concentração de peptídeos que regulam o apetite em humanos, encontraram redução da concentração de grelina acetilada durante e após o exercício (BROOM et al., 2009). Em ratos, a redução do consumo alimentar nas 24 horas subsequentes ao exercício também foi relatada (TIBANA et al., 2018). Como visto, a musculatura esquelética, quando estimulada a partir da prática de exercícios físicos, pode regular diversos processos através da secreção de proteínas denominadas miocinas, incluindo o consumo alimentar (PEDERSEN; FEBBRAIO, 2012). Estudos realizados com humanos e animais observaram aumento de miocinas, incluindo a irisina, após a prática de exercício resistido (KIM et al., 2016; REISI et al., 2016). Ferrante et al. (2016) relataram que a administração central da irisina reduziu o consumo de energia provavelmente devido à colocalização da irisina e do neuropeptídeo Y (NPY) no núcleo paraventricular. Os autores apresentaram evidências que sugerem que a redução da ingestão de energia foi resultado da estimulação do transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) e da pró-opiomelanocortina (POMC) (FERRANTE et al., 2016). Assim, a avaliação da

expressão de miocinas pode ser objetivo de futuros estudos com animais com PC que passaram por um protocolo de exercício resistido. Por fim, tendo em vista que para promover a adaptação musculotendinosa é necessário um treinamento adequado, assim como uma duração coerente com o tipo de estrutura e condição a ser estudada, são necessários estudos testando diferentes protocolos para determinar o mais adequado para continuar avaliando os efeitos do exercício resistido em animais com PC.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O PC experimental ocasionou uma resposta alterada do sistema neuroimune no hipocampo caracterizada pelo aumento da densidade e ativação de células microgliais, e superexpressão da IL-6. Os animais com PC também apresentaram prejuízos no peso corporal, no consumo alimentar, na força muscular, nos parâmetros da locomoção, na expressão de Akt total no sóleo, no peso e massa magra de músculos das patas posteriores e no comprimento da tibia. A suplementação de Cr em animais com PC foi capaz de reverter a superexpressão da expressão da IL-6 no hipocampo e mitigar as deficiências observadas no peso corporal, força e locomoção. Apesar disso, pouca influência foi observada com o treinamento resistido. Estes resultados demonstram que a suplementação de Cr pode ser usada como uma estratégia para reduzir os danos encontrados na PC.

REFERÊNCIAS

AGBULUT, O. et al. Myosin heavy chain isoforms in postnatal muscle development of mice. **Biology of the Cell**, v. 95, n. 6, p. 399–406, 2003.

AINGE, J. A.; LANGSTON, R. F. Ontogeny of neural circuits underlying spatial memory in the rat. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 6, 2012.

ALI, M. A.; KRAVITZ, A. V. Challenges in quantifying food intake in rodents. **Brain research**, v. 1693, n. Pt B, p. 188–191, 15 ago. 2018.

ALLAH YAR, R.; AKBAR, A.; IQBAL, F. Creatine monohydrate supplementation for 10 weeks mediates neuroprotection and improves learning/memory following neonatal hypoxia ischemia encephalopathy in female albino mice. **Brain Research**, v. 1595, p. 92–100, 2015.

ALMEIDA, F. M. et al. Creatine supplementation attenuates pulmonary and systemic effects of lung ischemia and reperfusion injury. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 35, n. 2, p. 242–250, 2016.

ALTMAN, J.; DAS, G. D. Altman_et_al-1965-The_Journal_of_Comparative_Neurology. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 124, p. 319–336, 1965.

ANAND, K.; DHIKAV, V. Hippocampus in health and disease: An overview. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 15, n. 4, p. 239–246, 2012.

ANDERSSON, C. et al. Adults with cerebral palsy: walking ability after progressive strength training. **Developmental medicine and child neurology**, v. 45, n. 4, p. 220–228, abr. 2003.

ANDREASSEN, O. A. et al. Creatine increases survival and delays motor symptoms in a transgenic animal model of Huntington's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 8, n. 3, p. 479–491, 2001.

ANTONIO, J. et al. Common questions and misconceptions about creatine supplementation: what does the scientific evidence really show? **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 1–17, 2021.

AOKI, M. S. et al. Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: Role of creatine supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 5, p. 1176–1183, 2004.

ATHERTON, P. J.; SMITH, K. Muscle protein synthesis in response to nutrition and exercise. **Journal of Physiology**, v. 590, n. 5, p. 1049–1057, 2012.

BALESTRINO, M.; ADRIANO, E. Beyond sports: Efficacy and safety of creatine supplementation in pathological or parapsychological conditions of brain and muscle. **Medicinal Research Reviews**, v. 39, n. 6, p. 2427–2459, 2019.

BALU, D. T.; LUCKI, I. Adult hippocampal neurogenesis: Regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 3, p. 232–252, mar. 2009.

BARTOLI, M.; RICHARD, I. Calpains in muscle wasting. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 10 SPEC. ISS., p. 2115–2133, 2005.

BASSIT, R. A.; CURI, R.; COSTA ROSA, L. F. B. P. Creatine supplementation reduces plasma levels of pro-inflammatory cytokines and PGE2 after a half-ironman competition. **Amino Acids**, v. 35, n. 2, p. 425–431, 2008.

BAX, M. et al. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 47, n. 8, p. 571, 2005.

BAX, M.; FLODMARK, O.; TYDEMAN, C. Definition and classification of cerebral palsy. From syndrome toward disease. **Dev Med Child Neurol Suppl**, v. 109, p. 39–41, 2007.

BEAL, M. F. Neuroprotective effects of creatine. **Amino acids**, v. 40, n. 5, p. 1305–1313, 2011.

BÉARD, E.; BRAISSANT, O. Synthesis and transport of creatine in the CNS: Importance for cerebral functions. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 2, p. 297–313, 2010.

BENDER, A. et al. Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. **Journal of Neurology**, v. 252, n. 1, p. 36–41, 2005.

BIOLO, G. et al. An abundant supply of amino acids enhances the metabolic effect of exercise on muscle protein. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 273, n. 1 36-1, 1997.

BLOMGREN, K.; HAGBERG, H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 3, p. 388–397, 2006.

BODINE, S. C.; BAEHR, L. M. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 6, p. E469–E484, 2014.

BONALDO, P.; SANDRI, M. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 25–39, 2013.

BOOTH, F. W. et al. Waging war on physical inactivity: using modernmolecular ammunition against an ancient enemy. p. 3–30, 2002.

BÖRSCH, A. et al. Molecular and phenotypic analysis of rodent models reveals conserved and species-specific modulators of human sarcopenia. **Communications Biology**, v. 4, n. 1, p. 1–15, 2021.

BRAISSANT, O.; BACHMANN, C.; HENRY, H. Expression and function of AGAT, GAMT and CT1 in the mammalian brain. **Subcellular Biochemistry**, v. 46, p. 67–81, 2007.

BRANCH, J. D. Effect of creatine supplementation on body composition and performance: A meta-analysis. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 198–226, 2003.

BREWER, G. J.; WALLIMANN, T. W. Protective effect of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and β -amyloid in rat hippocampal neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, n. 5, p. 1968–1978, 2000.

BROOM, D. R. et al. Influence of resistance and aerobic exercise on hunger, circulating levels of acylated ghrelin, and peptide YY in healthy males. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 296, n. 1, p. 29–35, 2009.

BROSNAN, M. E.; BROSNAN, J. T. The role of dietary creatine. **Amino Acids**, v. 48, n. 8, p. 1785–1791, 2016.

BURD, N. A. et al. Exercise training and protein metabolism: Influences of contraction, protein intake, and sex-based differences. **Journal of Applied Physiology**, v. 106, n. 5, p. 1692–1701, 2009.

BUTCHBACH, M. E. R. R. et al. A novel method for oral delivery of drug compounds to the neonatal SMN Δ 7 mouse model of spinal muscular atrophy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 161, n. 1, p. 285–290, 2008.

CANS, C. Surveillance of cerebral palsy in Europe: A collaboration of cerebral palsy surveys and registers. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 42, n. 12, p. 816–824, 2000.

CANU, M. H.; FALEMPIN, M. Effect of hindlimb unloading on interlimb coordination during treadmill locomotion in the rat. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 78, n. 6, p. 509–515, 1998.

CAREY, A. L. et al. Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. **Diabetes**, v. 55, n. 10, p. 2688–2697, 2006.

CASSILHAS, R. C. et al. Animal model for progressive resistance exercise: A detailed description of model and its implications for basic research in exercise. **Motriz. Revista de Educacao Fisica**, v. 19, n. 1, p. 178–184, 2013.

CELLA, P. S. et al. Creatine supplementation in Walker-256 tumor-bearing rats prevents skeletal muscle atrophy by attenuating systemic inflammation and protein degradation signaling. **European Journal of Nutrition**, v. 59, n. 2, p. 661–669, 2020.

CHO, J. W. et al. PI3K-Akt-Wnt pathway is implicated in exercise-induced improvement of short-term memory in cerebral palsy rats. **International Neurology**

Journal, v. 22, p. S156–S164, 2018.

CLAASSEN, H. et al. Muscle filament spacing and short-term heavy-resistance exercise in humans. **Journal of Physiology**, v. 3, p. 1–6, 1989.

CLANCY, B. et al. Extrapolating Brain Development From. v. 28, n. 5, p. 931–937, 2007.

CLOWRY, G. J.; BASUODAN, R.; CHAN, F. What are the best animal models for testing early intervention in cerebral palsy? **Frontiers in Neurology**, v. 5, n. DEC, p. 1–17, 2014.

COLLADO-GARRIDO, L. et al. Impact of resistance therapy on motor function in children with cerebral palsy: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 22, 2019.

COLVER, A.; FAIRHURST, C.; PHAROAH, P. O. D. Cerebral palsy. **The Lancet**, v. 383, n. 9924, 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, n. 1, p. 95–108, 2008.

COQ, J. O. et al. From cerebral palsy to developmental coordination disorder: Development of preclinical rat models corresponding to recent epidemiological changes. **Annals of Physical and Rehabilitation Medicine**, v. 63, n. 5, p. 422–430, 2020.

CORNISH, S. M. et al. A focused review of myokines as a potential contributor to muscle hypertrophy from resistance-based exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 120, n. 5, p. 941–959, 2020.

DA SILVA, R. P. et al. Synthesis of guanidinoacetate and creatine from amino acids by rat pancreas. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 4, p. 571–577, 2014.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: A neuroimmune response to activation of innate immunity. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, n. 1-3 SPEC. ISS., p. 399–411, 2004.

DELCOUR, M. et al. Early movement restriction leads to maladaptive plasticity in the sensorimotor cortex and to movement disorders. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018a.

DELCOUR, M. et al. Early movement restriction leads to enduring disorders in muscle and locomotion. **Brain Pathology**, v. 28, n. 6, p. 889–901, 2018b.

DELDICQUE, L. et al. Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 293, n. 4, 2007.

DELL'ANNA, M. E. et al. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity,

permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. **Behavioural Brain Research**, v. 45, n. 2, p. 125–134, 1991.

DENG, W. Neurobiology of injury to the developing brain. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 6, p. 328–336, 2010.

DEVERMAN, B. E.; PATTERSON, P. H. Cytokines and CNS Development. **Neuron**, v. 64, n. 1, p. 61–78, out. 2009.

DIAMOND, A. Rate of Maturation of the Hippocampus and the Developmental Progression of Children's Performance on the Delayed Non-Matching to Sample and Visual Paired Comparison Tasks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 608, n. 1 The Developme, p. 394–433, dez. 1990.

DIZ-CHAVES, Y. et al. Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 9, p. 1–10, 2012.

DODD, K. J.; TAYLOR, N. F.; DAMIANO, D. L. A systematic review of the effectiveness of strength-training programs for people with cerebral palsy. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 83, n. 8, p. 1157–1164, 2002.

DOLAN, E.; GUALANO, B.; RAWSON, E. S. Beyond muscle: the effects of creatine supplementation on brain creatine, cognitive processing, and traumatic brain injury. **European Journal of Sport Science**, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2019.

EGAN, B.; ZIERATH, J. R. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 2, p. 162–184, 2013.

EGERMAN, M. A.; GLASS, D. J. Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 49, n. 1, p. 59–68, 2014.

EICHENBAUM, H.; COHEN, N. J. Can We Reconcile the Declarative Memory and Spatial Navigation Views on Hippocampal Function? **Neuron**, v. 83, n. 4, p. 764–770, ago. 2014.

EKDAHL, C. T. et al. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 23, p. 13632–13637, 2003.

EKDAHL, C. T. Microglial activation-tuning and pruning adult neurogenesis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3 MAR, n. March, p. 1–9, 2012.

ENESCO, M.; PUDDY, D. Increase in the number of nuclei and weight in skeletal muscle of rats of various ages. **American Journal of Anatomy**, v. 114, n. 2, p. 235–244, mar. 1964.

ERIKSSON, P. S. et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Medicine**, v. 4, n. 11, p. 1313–1317, nov. 1998.

FAVRAIS, G. et al. Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. **Annals of Neurology**, v. 70, n. 4, p. 550–565, out. 2011.

FERRANTE, C. et al. Central inhibitory effects on feeding induced by the adipomyokine irisin. **European Journal of Pharmacology**, v. 791, p. 389–394, nov. 2016.

FERRANTE, R. J. et al. Neuroprotective effects of creatine in a transgenic Mouse model of Huntington's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 12, p. 4389–4397, 2000.

FOSTER, K. G.; FINGAR, D. C. Mammalian target of rapamycin (mTOR): Conducting the cellular signaling symphony. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14071–14077, 2010.

FULD, J. P. et al. Creatine supplementation during pulmonary rehabilitation in chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax**, v. 60, n. 7, p. 531–537, 2005.

GALBRAITH, R. A.; FURUKAWA, M.; LI, M. Possible role of creatine concentrations in the brain in regulating appetite and weight. **Brain Research**, v. 1101, n. 1, p. 85–91, 2006.

GALEA, C. et al. Cerebral palsy trends in Australia (1995-2009): a population-based observational study. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 61, n. 2, p. 186–193, fev. 2019.

GENIUS, J. et al. Creatine protects against excitotoxicity in an in vitro model of neurodegeneration. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1–8, 2012.

GILBERT, P. E.; BRUSHFIELD, A. M. The role of the CA3 hippocampal subregion in spatial memory: A process oriented behavioral assessment. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 33, n. 5, p. 774–781, ago. 2009.

GINGRAS, A. et al. Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. p. 1422–1437, 1999.

GLORE, S. R.; LAYMAN, D. K. Cellular development of skeletal muscle during early periods of nutritional restriction and subsequent rehabilitation. **Pediatric Research**, v. 17, n. 7, p. 602–605, 1983.

GLOVER, E. I. et al. Immobilization induces anabolic resistance in human myofibrillar protein synthesis with low and high dose amino acid infusion. **Journal of Physiology**, v. 586, n. 24, p. 6049–6061, 2008.

GLOVER, E. I. et al. Little change in markers of protein breakdown and oxidative stress in humans in immobilization-induced skeletal muscle atrophy. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 35, n. 2, p. 125–133, 2010.

GLYNN, E. L. et al. Muscle protein breakdown has a minor role in the protein anabolic response to essential amino acid and carbohydrate intake following resistance exercise. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and**

Comparative Physiology, v. 299, n. 2, p. 533–540, 2010.

GORISSEN, S. H. M.; RÉMOND, D.; VAN LOON, L. J. C. The muscle protein synthetic response to food ingestion. **Meat Science**, v. 109, p. 96–100, 2015.

GOTSHALK, L. A. et al. Creatine supplementation improves muscular performance in older men. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 34, n. 3, p. 537–543, mar. 2002.

GOTSHALK, L. A. et al. Creatine supplementation improves muscular performance in older women. **European Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 2, p. 223–231, 15 nov. 2007.

GRAHAM, H. K. et al. Cerebral palsy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. 1, p. 15082, 22 dez. 2016.

GUALANO, B. et al. Creatine supplementation in the aging population: effects on skeletal muscle, bone and brain. **Amino Acids**, v. 48, n. 8, p. 1793–1805, 2016.

GUIMARÃES-FERREIRA, L. et al. Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle. **European Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 11, p. 3905–3911, 2012.

GUO, S. et al. Impacts of exercise interventions on different diseases and organ functions in mice. **Journal of Sport and Health Science**, v. 9, n. 1, p. 53–73, 2020.

HALL, M.; TROJIAN, T. H. Creatine supplementation. **Current Sports Medicine Reports**, v. 12, n. 4, p. 240–244, 2013.

HAMER, M.; CHIDA, Y. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: A systematic review of prospective evidence. **Psychological Medicine**, v. 39, n. 1, p. 3–11, 2008.

HAMRICK, M. W. A Role for Myokines in Muscle-Bone Interactions Introduction: Basic Mechanisms of Muscle-Bone Interactions. v. 39, n. 1, p. 43–47, 2011.

HASS, C. J.; COLLINS, M. A.; JUNCOS, J. L. Resistance training with creatine monohydrate improves upper-body strength in patients with Parkinson disease: A randomized trial. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 21, n. 2, p. 107–115, 2007.

HEROLD, S. et al. CatWalk gait analysis in a rat model of multiple sclerosis. **BMC Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2016.

HERSHEY, J. W. B. Translational control in mammalian cells. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 60, p. 717–55, 1991.

HESPEL, P. et al. Muscle disuse due to physical inactivity. p. 625–633, 2001.

HEVNER, R. F. Evolution of the mammalian dentate gyrus. **Journal of Comparative Neurology**, v. 524, n. 3, p. 578–594, 15 fev. 2016.

HODSON, N. et al. Molecular regulation of human skeletal muscle protein synthesis in response to exercise and nutrients: A compass for overcoming age-related anabolic resistance. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 317, n. 6, p. C1061–C1078, 2019.

HOEGER, H. et al. Long term neurological and behavioral effects of graded perinatal asphyxia in the rat. **Life Sciences**, v. 66, n. 10, p. 947–962, 2000.

HOJMAN, P. et al. Fibroblast growth factor-21 is induced in human skeletal muscles by hyperinsulinemia. **Diabetes**, v. 58, n. 12, p. 2797–2801, 2009.

HOWARD, J. J.; HERZOG, W. Skeletal Muscle in Cerebral Palsy: From Belly to Myofibril. **Frontiers in Neurology**, v. 12, n. February, p. 1–15, 2021.

HULTMAN, E. et al. Muscle creatine loading in men. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, n. 1, p. 232–237, 1996.

IOSIF, R. E. et al. Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 38, p. 9703–9712, 2006.

ITO, J. ICHI et al. Muscle histopathology in spastic cerebral palsy. **Brain and Development**, v. 18, n. 4, p. 299–303, 1996.

JANTZIE, L. L.; ROBINSON, S. Preclinical Models of Encephalopathy of Prematurity. **Developmental Neuroscience**, v. 37, n. 4–5, p. 277–288, 2015.

JENSEN, C. S. et al. Exercise as a potential modulator of inflammation in patients with Alzheimer's disease measured in cerebrospinal fluid and plasma. **Experimental Gerontology**, v. 121, n. April, p. 91–98, 2019.

JEON, Y. K.; HA, C. H. The effect of exercise intensity on brain derived neurotrophic factor and memory in adolescents. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 22, n. 1, p. 1–6, 2017.

JOANISSE, S. et al. Recent advances in understanding resistance exercise training-induced skeletal muscle hypertrophy in humans. **F1000Research**, v. 9, p. 1–12, 2020.

JONES, D. G.; DYSON, S. E. The influence of protein restriction, rehabilitation and changing nutritional status on synaptic development: A quantitative study in rat brain. **Brain Research**, v. 208, n. 1, p. 97–111, 1981.

KANDALLA, P. K. et al. Mechano Growth Factor E peptide (MGF-E), derived from an isoform of IGF-1, activates human muscle progenitor cells and induces an increase in their fusion potential at different ages. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 132, n. 4, p. 154–162, 2011.

KAVIANI, M.; SHAW, K.; CHILIBECK, P. D. Benefits of creatine supplementation for vegetarians compared to omnivorous athletes: A systematic review. **International**

Journal of Environmental Research and Public Health, v. 17, n. 9, p. 1–14, 2020.

KEMPERMANN, G. et al. Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions. **Cell Stem Cell**, v. 23, n. 1, p. 25–30, 2018.

KIM, E. J.; PELLMAN, B.; KIM, J. J. Stress effects on the hippocampus: A critical review. **Learning and Memory**, v. 22, n. 9, p. 411–416, 2015.

KIM, H.-J. et al. Effect of Aerobic Training and Resistance Training on Circulating Irisin Level and Their Association With Change of Body Composition in Overweight/Obese Adults: a Pilot Study. **Physiological Research**, p. 271–279, 29 abr. 2016.

KOBAYASHI, J. et al. Molecular regulation of skeletal muscle mass and the contribution of nitric oxide: A review. **FASEB BioAdvances**, v. 1, n. 6, p. 364–374, 2019.

KOZAREVA, D. A.; CRYAN, J. F.; NOLAN, Y. M. Born this way: Hippocampal neurogenesis across the lifespan. **Aging Cell**, v. 18, n. 5, p. 1–18, 2019.

KREIDER, R. B. et al. International Society of Sports Nutrition position stand: Safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 14, n. 1, p. 1–18, 2017.

KRICK, J.; DUYN, M. A. VAN. The relationship between oral-motor involvement and growth: a pilot study in a pediatric population with cerebral palsy. **J Am Diet Assoc**, v. 84, n. 5, p. 555–9, 1984.

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

KROGH-MADSEN, R. et al. A 2-wk reduction of ambulatory activity attenuates peripheral insulin sensitivity. **Journal of Applied Physiology**, v. 108, n. 5, p. 1034–1040, 2010.

KUGELBERG, E. Adaptive transformation of rat soleus motor units during growth. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 27, n. 3, p. 269–289, 1976.

LACERDA, D. C. et al. Oro-facial functions in experimental models of cerebral palsy: a systematic review. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 44, n. 4, p. 251–260, 2017a.

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

LACERDA, D. C. et al. Treatment with the essential amino acid L-tryptophan reduces masticatory impairments in experimental cerebral palsy. **Nutritional Neuroscience**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2019.

LAJUD, N.; TORNER, L. Early life stress and hippocampal neurogenesis in the

neonate: Sexual dimorphism, long term consequences and possible mediators. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 8, n. FEB, p. 1–10, 2015.

LANCASTER, G. I.; FEBBRAIO, M. A. The immunomodulating role of exercise in metabolic disease. **Trends in Immunology**, v. 35, n. 6, p. 262–269, 2014.

LAWLER, J. M. et al. Direct antioxidant properties of creatine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 1, p. 47–52, 2002.

LEE, J. H.; JUN, H. S. Role of myokines in regulating skeletal muscle mass and function. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. JAN, p. 1–9, 2019.

LEEM, Y.-H.; KATO, M.; CHANG, H. Regular exercise and creatine supplementation prevent chronic mild stress-induced decrease in hippocampal neurogenesis via Wnt/GSK3 β / β -catenin pathway. **Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry**, v. 22, n. 2, p. 1–6, 2018.

LIMA, C. L.; FONSECA, L. F. **Paralisia cerebral: neurologia, ortopedia, reabilitação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LIN, M. T.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787–795, 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.

MA, D. K.; MING, G. L.; SONG, H. Glial influences on neural stem cell development: Cellular niches for adult neurogenesis. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 15, n. 5, p. 514–520, 2005.

MAESTRO-GONZALEZ, A. et al. Quality of life as assessed by adults with cerebral palsy. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–12, 2018.

MAGALHÃES, R. C. et al. Inflammatory biomarkers in children with cerebral palsy: A systematic review. **Research in Developmental Disabilities**, v. 95, n. September, 2019.

MANCINI, M. C. et al. Comparison of functional activity performance in normally developing children and children with cerebral palsy. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 60, n. 2 B, p. 446–452, 2002.

MANTOANI, L. C. et al. Physical activity in patients with COPD: the impact of comorbidities. **Expert Review of Respiratory Medicine**, v. 11, n. 9, p. 685–698, 2017.

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

MARZUCA-NASSR, G. N. et al. Short-term creatine supplementation changes protein metabolism signaling in hindlimb suspension. **Brazilian Journal of Medical and**

Biological Research, v. 52, n. 10, p. 1–12, 2019.

MATTHEWS, R. T. et al. Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. **Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 156–163, 1998.

MATTHEWS, R. T. et al. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. **Experimental Neurology**, v. 157, n. 1, p. 142–149, 1999.

MCGLORY, C.; DEVRIES, M. C.; PHILLIPS, S. M. Skeletal muscle and resistance exercise training; The role of protein synthesis in recovery and remodeling. **Journal of Applied Physiology**, v. 122, n. 3, p. 541–548, 2017.

MCGLORY, C.; PHILLIPS, S. M. **Exercise and the Regulation of Skeletal Muscle Hypertrophy**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 135

MCINTYRE, S. et al. Global prevalence of cerebral palsy: A systematic analysis. **Developmental Medicine and Child Neurology**, 2022.

MCLEOD, J. C.; STOKES, T.; PHILLIPS, S. M. Resistance exercise training as a primary countermeasure to age-related chronic disease. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. JUN, 2019.

MCRAE, A. et al. Microglia activation after neonatal hypoxic-ischemia. **Developmental Brain Research**, v. 84, n. 2, p. 245–252, 1995.

MERINO-ANDRÉS, J. et al. Effect of muscle strength training in children and adolescents with spastic cerebral palsy: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Rehabilitation**, v. 36, n. 1, p. 4–14, 2022.

MITCHELL, C. J. et al. What is the relationship between the acute muscle protein synthesis response and changes in muscle mass? **Journal of Applied Physiology**, v. 118, n. 4, p. 495–497, 2015.

MONICO-NETO, M. et al. Resistance training minimizes catabolic effects induced by sleep deprivation in rats. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 40, n. 11, p. 1143–1150, 2015.

MONJE, M. L.; TODA, H.; PALMER, T. D. Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1760–1765, 2003.

MONNINKHOF, E. M. et al. Physical activity and breast cancer: A systematic review. **Epidemiology**, v. 18, n. 1, p. 137–157, 2007.

MORGAN, C. et al. Effectiveness of motor interventions in infants with cerebral palsy: a systematic review. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 58, n. 9, p. 900–909, 2016.

MURAI, I. H. et al. Exercise training, creatine supplementation, and bone health in ovariectomized rats. **Osteoporosis International**, v. 26, n. 4, p. 1395–1404, 2015.

MURTON, A. J.; CONSTANTIN, D.; GREENHAFF, P. L. The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1782, n. 12, p. 730–743, 2008.

NAYAK, D.; ROTH, T. L.; MCGAVERN, D. B. Microglia Development and Function. **Annual Review of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 367–402, 21 mar. 2014.

NOCON, M. et al. Association of physical activity with all-cause and cardiovascular mortality: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Preventive Cardiology**, v. 15, n. 3, p. 239–246, 2008.

NOMURA, A. et al. Anti-inflammatory activity of creatine supplementation in endothelial cells in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, n. 4, p. 715–720, 2003.

NOVAES GOMES, F. G. et al. The beneficial effects of strength exercise on hippocampal cell proliferation and apoptotic signaling is impaired by anabolic androgenic steroids. **Psychoneuroendocrinology**, v. 50, p. 106–117, 2014.

NYSTORIAK, M. A.; BHATNAGAR, A. Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. **Frontiers in Cardiovascular Medicine**, v. 5, n. September, p. 1–11, 2018.

O’GORMAN, E. et al. The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. **FEBS Letters**, v. 414, n. 2, p. 253–257, 1997.

OLIVIER, P. et al. Prenatal ischemia and white matter damage in rats. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 64, n. 11, p. 998–1006, 2005.

PALMER, T. D.; RAY, J.; GAGE, F. H. **FGF-2-responsive neuronal progenitors reside in proliferative and quiescent regions of the adult rodent brain** *Molecular and Cellular Neurosciences*, 1995.

PALMER, T. D.; TAKAHASHI, J.; GAGE, F. H. The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. **Molecular and Cellular Neurosciences**, v. 8, n. 6, p. 389–404, 1997.

PARK, E.-Y. E.-Y.; KIM, W.-H. W.-H. Meta-analysis of the effect of strengthening interventions in individuals with cerebral palsy. **Research in developmental disabilities**, v. 35, n. 2, p. 239–249, fev. 2014.

PEDERSEN, B. K.; FEBBRAIO, M. A. Muscles, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 8, p. 457–465, 2012.

PEDERSEN, B. K.; ROHDE, T.; OSTROWSKI, K. Recovery of the immune system after exercise. [Miscellaneous Article]. **Acta Physiologica Scandinavica March 1998;162(3):325-332**, p. 325–332, 1998.

PEREIRA, S. DA C. et al. Fibroblast growth factor 19 as a countermeasure to

muscle and locomotion dysfunctions in experimental cerebral palsy. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 12, n. 6, p. 2122–2133, 2021.

PERSKY, A. P.; BRAZEAU, G. A. Clinical Pharmacology of the Dietary Supplement Creatine Monohydrate. v. 53, n. 2, p. 161–176, 2001.

PETRELLA, J. K. et al. Potent myofiber hypertrophy during resistance training in humans is associated with satellite cell-mediated myonuclear addition: A cluster analysis. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 6, p. 1736–1742, 2008.

PHILLIPS, S. M. Protein requirements and supplementation in strength sports. **Nutrition**, v. 20, n. 7–8, p. 689–695, 2004.

PHILLIPS, S. M. Physiologic and molecular bases of muscle hypertrophy and atrophy: Impact of resistance exercise on human skeletal muscle (protein and exercise dose effects). **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v. 34, n. 3, p. 403–410, 2009.

PHILLIPS, S. M.; GLOVER, E. I.; RENNIE, M. J. Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. **Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 3, p. 645–654, 2009.

PINGEL, J. et al. Systemic inflammatory markers in individuals with cerebral palsy. **European Journal of Inflammation**, v. 17, 2019.

PINHO, R. A.; AGUIAR, A. S.; RADÁK, Z. Effects of resistance exercise on cerebral redox regulation and cognition: An interplay between muscle and brain. **Antioxidants**, v. 8, n. 11, 2019.

POPESCU, M. R. et al. Getting an Early Start in Understanding Perinatal Asphyxia Impact on the Cardiovascular System. **Frontiers in Pediatrics**, v. 8, n. February, p. 1–18, 2020.

RADAK, Z. et al. The redox-associated adaptive response of brain to physical exercise. **Free Radical Research**, v. 48, n. 1, p. 84–92, 2014.

RADAK, Z. et al. Physical exercise, reactive oxygen species and neuroprotection. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 98, p. 187–196, 2016.

RAKIC, P.; NOWAKOWSKI, R. S. The time of origin of neurons in the hippocampal region of the rhesus monkey. **The Journal of comparative neurology**, v. 196, n. 1, p. 99–128, 10 fev. 1981.

RAMASAMY, S. et al. Neural stem cell survival factors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 534, n. 1–2, p. 71–87, 2013.

RAWSON, E. S.; VOLEK, J. S. Effects of Creatine Supplementation and Resistance Training on Muscle Strength and Weightlifting Performance. **Journal of Strength and Conditioning Research**, v. 17, n. 4, p. 822–831, 2003.

RAWSON, E. S.; WEHNERT, M. L.; CLARKSON, P. M. Effects of 30 days of creatine ingestion in older men. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 80, n. 2, p. 139–144, jun. 1999.

REISI, J. et al. Can Resistance Exercise Alter Irisin Levels and Expression Profiles of FNDC5 and UCP1 in Rats? **Asian journal of sports medicine**, v. 7, n. 4, p. e35205, dez. 2016.

RETHLEFSEN, S. A.; RYAN, D. D.; KAY, R. M. Classification systems in cerebral palsy. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 41, n. 4, p. 457–467, 2010.

RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 3, p. 511–533, 2000.

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

ROQUE, A.; OCHOA-ZARZOSA, A.; TORNER, L. Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 55, p. 39–48, 2016.

ROSAS, H. D. et al. PRECREST: A phase II prevention and biomarker trial of creatine in at-risk huntington disease. **Neurology**, v. 82, n. 10, p. 850–857, 2014.

ROSS, S. M.; MACDONALD, M.; BIGOUILLE, J. P. Effects of strength training on mobility in adults with cerebral palsy: A systematic review. **Disability and Health Journal**, v. 9, n. 3, p. 375–384, 2016.

RUDRAPPA, S. S. et al. Human skeletal muscle disuse atrophy: Effects on muscle protein synthesis, breakdown, and insulin resistance-A qualitative review. **Frontiers in Physiology**, v. 7, n. AUG, p. 1–10, 2016.

RUMAJOGEE, P. et al. Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: A systematic review. **Frontiers in Neurology**, v. 7, n. APR, 2016.

SAAVEDRA, L. M. et al. Long-term activation of hippocampal glial cells and altered emotional behavior in male and female adult rats after different neonatal stressors. **Psychoneuroendocrinology**, v. 126, n. February, 2021.

SAAVEDRA, L. M.; NAVARRO, B. F.; TORNER, L. Early Life Stress Activates Glial Cells in the Hippocampus but Attenuates Cytokine Secretion in Response to an Immune Challenge in Rat Pups. **NeuroImmunoModulation**, v. 24, n. 4–5, p. 242–255, 2018.

SAFDAR, A. et al. Global and targeted gene expression and protein content in skeletal muscle of young men following short-term creatine monohydrate supplementation. **Physiological Genomics**, v. 32, n. 2, p. 219–228, 2008.

SAKKAS, G. K.; SCHAMBELAN, M.; MULLIGAN, K. Can the use of creatine supplementation attenuate muscle loss in cachexia and wasting? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 12, n. 6, p. 623–627, 2009.

SAMBASIVAN, R.; TAJBAKHSI, S. Skeletal muscle stem cell birth and properties. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 18, n. 6, p. 870–882, 2007.

SANDRI, M. et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 399–412, 2004.

SANGER, T. D. et al. Hypertonia in Childhood. **Pediatrics**, v. 111, n. 1, p. 89–97, 2003.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber types in Mammalian skeletal muscles. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, 2011.

SCHOENFELD, B. J. The mechanisms of muscle hypertrophy and their application to resistance training. v. 24, n. 10, p. 2857–2872, 2010.

SCIANNI, A. et al. Muscle strengthening is not effective in children and adolescents with cerebral palsy: a systematic review. **Australian Journal of Physiotherapy**, v. 55, n. 2, p. 81–87, 2009.

SELLIER, E. et al. Decreasing prevalence in cerebral palsy: a multi-site European population-based study, 1980 to 2003. **Developmental Medicine & Child Neurology**, v. 58, n. 1, p. 85–92, jan. 2016.

SEMPLE, B. D. et al. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, v. 106–107, n. 10, p. 1–16, jul. 2013.

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

SMITH, P. L. P. et al. Neonatal Peripheral Immune Challenge Activates Microglia and Inhibits Neurogenesis in the Developing Murine Hippocampus. **Developmental Neuroscience**, v. 36, n. 2, p. 119–131, 2014.

SNOW, W. M. et al. Chronic dietary creatine enhances hippocampal-dependent spatial memory, bioenergetics, and levels of plasticity-related proteins associated with NF- κ B. **Learning and Memory**, v. 25, n. 2, p. 54–66, 2018.

SON, J. S. et al. Effect of resistance ladder training on sparc expression in skeletal muscle of hindlimb immobilized rats. **Muscle and Nerve**, v. 53, n. 6, p. 951–957, 2016.

SONG, Z. et al. Resistance exercise initiates mechanistic target of rapamycin (mTOR) translocation and protein complex co-localisation in human skeletal muscle. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

STOUT, J. R. et al. Effects of creatine supplementation on the onset of neuromuscular fatigue threshold and muscle strength in elderly men and women (64 - 86 years). **The journal of nutrition, health & aging**, v. 11, n. 6, p. 459–64, 2007.

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

SUMMERS, P. J.; MEDRANO, J. F. Morphometric analysis of skeletal muscle growth in the high growth mouse. **Growth, development, and aging : GDA**, v. 58, n. 3, p. 135–48, 1994.

T AFLAMPAS, G. et al. Interventions to Improve or Maintain Lower-Limb Function Among Ambulatory Adolescents with Cerebral Palsy: A Cross-Sectional Survey of Current Practice in the UK. **Physical and Occupational Therapy in Pediatrics**, v. 38, n. 4, p. 355–369, 2018.

TAHRAOUI, S. L. et al. Central Role of Microglia in Neonatal Excitotoxic Lesions of the Murine Periventricular White Matter. **Brain Pathology**, v. 11, n. 1, p. 56–71, 5 abr. 2006.

TAKESHITA, H. et al. Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline in skeletal muscle function in male mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. November 2015, p. 1–9, 2017.

TARNOPOLSKY, M. A. Creatine as a therapeutic strategy for myopathies. **Amino acids**, v. 40, n. 5, p. 1397–1407, 2011.

TARNOPOLSKY, M. A.; ROY, B. D.; MACDONALD, J. R. a Randomized , Controlled Trial of Creatine Monohydrate in Patients With. n. December, p. 1502–1509, 1997.

THIEBAUD, D. et al. The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man. **Diabetes**, v. 31, n. 11, p. 957–963, 1982.

TIBANA, R. A. et al. Effects of different volumes of resistance exercise on the food intake of rats. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 24, n. 2, p. 145–148, 2018.

TONG, L. et al. Effects of exercise on gene-expression profile in the rat hippocampus. **Neurobiology of Disease**, v. 8, n. 6, p. 1046–1056, 2001.

TRAN, N. T. et al. Assessing creatine supplementation for neuroprotection against perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy: A systematic review of perinatal and adult pre-clinical studies. **Cells**, v. 10, n. 11, 2021.

TREMBLAY, S. et al. Systemic inflammation combined with neonatal cerebellar haemorrhage aggravates long-term structural and functional outcomes in a mouse model. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 66, p. 257–276, 2017.

TUOMILEHTO, J. et al. Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus By Changes in Lifestyle Among Subjects With Impaired Glucose Tolerance. v. 344, n. 18, p. 1343–1350, 2001.

TUON, T. et al. Physical training prevents depressive symptoms and a decrease in brain-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. **Brain Research Bulletin**, v. 108, p. 106–112, 2014.

TURNER, D. C.; SEABORNE, R. A.; SHARPLES, A. P. Comparative Transcriptome and Methylome Analysis in Human Skeletal Muscle Anabolism, Hypertrophy and Epigenetic Memory. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

VAN LOON, L. J. C. et al. Effects of creatine loading and prolonged creatine supplementation on body composition, fuel selection, sprint and endurance performance in humans. **Clinical Science**, v. 104, n. 2, p. 153–162, 2003.

VIS, J. C. et al. Creatine protects against 3-nitropropionic acid-induced cell death in murine corticostriatal slice cultures. **Brain Research**, v. 1024, n. 1–2, p. 16–24, 2004.

VISCO, D. B. et al. A systematic review of neurogenesis in animal models of early brain damage: Implications for cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 340, n. February, 2021.

VISCO, D. B. et al. NEONATAL KAEMPFEROL EXPOSURE ATTENUATES GAIT AND STRENGTH DEFICITS AND PREVENTS ALTERED MUSCLE PHENOTYPE IN A RAT MODEL OF CEREBRAL PALSY. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 7 nov. 2022.

VOLEK, J. S. et al. Performance and muscle fiber adaptations to creatine supplementation and heavy resistance training. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 31, n. 8, p. 1147–1156, 1999.

VOLPE, J. J. Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 1, p. 110–124, jan. 2009.

WALKER, J. B. Creatine: Biosynthesis, regulation, and function. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biol**, v. 50, 1979.

WALL, B. T.; VAN LOON, L. J. Nutritional strategies to attenuate muscle disuse atrophy. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 4, p. 195–208, 2013.

WALLIMANN, T. et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: The “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. **Biochemical Journal**, v. 281, n. 1, p. 21–40, 1992.

WALZEL, B. et al. Novel mitochondrial creatine transport activity. Implications for intracellular creatine compartments and bioenergetics. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37503–37511, 2002.

WANG, T. et al. Proteomic changes in the hippocampus and motor cortex in a rat model of cerebral palsy: Effects of topical treatment. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 133, n. November 2020, p. 110844, 2021.

WANG, X. et al. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70 S6 kinase. **EMBO Journal**, v. 20, n. 16, p. 4370–4379, 2001.

WHALEN, R. G. et al. A developmentally regulated disappearance of slow myosin in fast-type muscles of the mouse. **FEBS Letters**, v. 177, n. 1, p. 51–56, 1984.

WILLIAMS, P.; LORD, S. R. Effects of group exercise on cognitive functioning and mood in older women. **Public Health**, n. 1, p. 45–52, 1997.

WILLOUGHBY, D. S.; ROSENE, J. M. Effects of oral creatine and resistance training on myogenic regulatory factor expression. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 35, n. 6, p. 923–929, 2003.

WOLFE, R. R. The underappreciated role of muscle in health and disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 84, n. 3, p. 475–482, 1 dez. 2006.

WUNDERLICH, F. T. et al. Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action. **Cell Metabolism**, v. 12, n. 3, p. 237–249, 2010.

WYSS, M.; KADDURAH-DAOUK, R. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 3, p. 1107–1213, 2000.

YANG, J. **Enhanced skeletal muscle for effective glucose homeostasis**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 121

YEARGIN-ALLSOPP, M. et al. Prevalence of cerebral palsy in 8-year-old children in three areas of the united states in 2002: A multisite collaboration. **Pediatrics**, v. 121, n. 3, p. 547–554, 2008.

YIRMIYA, R.; GOSHEN, I. Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 2, p. 181–213, 2011.

YOU, J. S. et al. The role of raptor in the mechanical load-induced regulation of mTOR signaling, protein synthesis, and skeletal muscle hypertrophy. **FASEB Journal**, v. 33, n. 3, p. 4021–4034, 2019.

ZHANG, S. et al. Birth Asphyxia Is Associated With Increased Risk of Cerebral Palsy: A Meta-Analysis. **Frontiers in Neurology**, v. 11, n. July, p. 1–8, 2020.

ZHU, S. et al. Prophylactic creatine administration mediates neuroprotection in cerebral ischemia in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 26, p. 5909–5912, 2004.

ZURLO, F. et al. Skeletal muscle metabolism is a major determinant of resting energy expenditure. **Journal of Clinical Investigation**, v. 86, n. 5, p. 1423–1427, 1990.

**APÊNDICE A – Artigo de opinião publicado na revista Clinical Nutrition
ESPEN**

Creatine supplementation to improve the peripheral and central inflammatory profile in Cerebral Palsy

Henrique J. C. B. Gouveia^{a,b}, Raul Manhães-de-Castro^{b,c}, Diego Cabral Lacerda^d and Ana Elisa Toscano^{b,c,e*}

^aPostgraduate Program in Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^bStudies in Nutrition and Phenotypic Plasticity Unit, Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^cDepartment of Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^dDepartment of Human Anatomy, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

^eDepartment of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

Address of corresponding author:

*Ana Elisa Toscano

Department of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco (UFPE) - Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, 55608-680 – Vitória de Santo Antão - PE, Brazil.

Telephone: +55 (081) 35233351. Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0002-7216-6523>

Email: aeltoscano@yahoo.com.br

Summary: This opinion paper presents a brief review on the potential use of Creatine (Cr) to improve the inflammatory profile in individuals with Cerebral Palsy (CP). CP is a condition that causes muscle atrophy followed by reduced strength and altered muscle tone. The prevalence of chronic diseases is higher in people with CP due to this, which are often associated with peripheral inflammation, but there are no studies that have evaluated central inflammation in this condition. Nevertheless, the anti-inflammatory action of Cr has already been observed in different types of studies. Thus, the use of experimental models of CP to evaluate the expression of the inflammatory markers, especially in the brain, as well as approaches to reduce the impairments already observed becomes essential. Results obtained in these preclinical studies may contribute to the quality of therapeutic strategies offered to children suffering from CP, the most common cause of chronic motor disability in childhood.

Keywords: Inflammation; Creatine; Natural Compounds; Neuroprotection; Developmental disabilities; Brain damage.

1. Introduction and discussion

Cr is a nitrogenous amine found mainly in skeletal muscles and frequently used as a nutritional supplement by athletes in anaerobic sports (Hall & Trojian, 2013). Within cells, Cr in its phosphorylated form (PCr) plays an important role in the phosphagen adenosine triphosphate (ATP)/PCr energy system (Wallimann et al., 1992), and it can be obtained from foods such as meat, fish, and seeds or dietary supplements (Kreider et al., 2017). Due to elucidation of the anabolic and neuroprotective effects, studies suggest that Cr has potential for promotion, protection, prevention, recovery, and rehabilitation actions (Dolan et al., 2019). Moreover, this substance does not result in kidney damage and renal dysfunction when ingested at recommended dosages and is considered safe for children and teenagers, as well as for patients with muscle wasting diseases (Antonio et al., 2021; Sakkas et al., 2009), which is observed in CP and often described as hallmark phenotype of CP (Verschuren et al., 2018).

CP is a condition that influences movement, and in more severe forms, the ability of the individual to perform most of the daily activities due to altered muscle tone (Bax et al., 2005). In most cases, the main prevalent motor abnormality is spasticity. Epidemiological data indicate that spastic CP, characterized by increased muscle tone and pathological reflexes is the most common type, accounting for 80% of cases

(Clowry et al., 2014). CP requires long-standing dependent care and the involvement of primary care physicians and neurology specialists. Rehabilitation is usually carried out using simple methods such as muscle stretching, strengthening, and massage, but also more complex methods such as conductive education and motor learning-based neurorehabilitation.

Due to the impairment of skeletal muscle and a sedentary lifestyle, the prevalence of chronic diseases such as diabetes, hypertension, and arthritis are also higher in people with CP compared to their typically developed peers (Peterson et al., 2015). These conditions are often associated with inflammation, as demonstrated by a recent study that assessed levels of inflammatory markers in children with CP (Pingel et al., 2019). In this study, the authors found alterations in transforming growth factor-beta 1 (TGFB1) and C-reactive protein (CRP) levels (Pingel et al., 2019). In another study, higher circulating levels of interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), and C-X-C motif chemokine ligand 8, a gene that encodes interleukin 8 (CXCL8/IL-8), were also associated with abnormal neurological outcomes in children with CP (Magalhães et al., 2019). However, there is a lack of studies that have evaluated the levels of these substances in specific areas of the brain, as well as approaches to reduce the impairments. Thus, the use of experimental models to evaluate the expression of these inflammatory markers, especially in the brain, becomes essential.

Experimental models induced by oxygen restriction and disuse were successful in causing impairments like those observed in humans (Canu & Falempin, 1998; Coq et al., 2008; Pereira et al., 2021; Strata et al., 2004). Strata et al. (2004) reported long-lasting effects such as reduced body weight, increased muscle tone, abnormal locomotion patterns, and disorganization in the motor cortex (Strata et al., 2004). Later, Coq et al. (2008) demonstrated that this motor behavior was associated with muscle fiber atrophy, joint and knee degeneration, and distorted representation of the lower limbs in the primary somatosensory cortex. In contrast, perinatal asphyxia caused only mild changes in muscle tone, motor performance, and cortical organization (Coq et al., 2008). Thus, the association of perinatal asphyxia and muscle disuse by sensory-motor restriction is a simple, effective, and reproducible model of a motor phenotype comparable to human CP.

In previous studies, we have tried pharmacological and nutritional interventions in an experimental model of CP. We observed increased masticatory maturation after

tryptophan supplementation, a precursor of serotonin, evidenced by increased weight and proportion of type IIB masseter fibers, and improvement in the number of chewing movements in rats subjected to CP (Lacerda et al., 2019). We also show that pharmacological intervention with recombinant Fibroblast growth factor 19 increased muscle strength, muscle weight, and locomotor activity in rats with CP (Pereira et al., 2021). Following this evaluation, we believe that it is pertinent to explore strategies, such as Cr supplementation, to assess their ability to reduce the expression of inflammatory cytokines. The shreds of evidence suggest that Cr may exert its effects directly or indirectly through multiple mechanisms, such as protein synthesis/myogenesis, inflammation, and oxidative stress (Bassit et al., 2008; Deldicque et al., 2007; Guimarães-Ferreira et al., 2012), in addition to neuroprotection (Bender et al., 2005; Genius et al., 2012; Lawler et al., 2002), in *in vitro* studies, and preclinical or clinical studies.

In preclinical studies, Cr supplementation prevented muscle atrophy by attenuating systemic inflammation and protein degradation pathways in Walker-256 tumor-bearing rats (Cella et al., 2020). The authors reported reduced plasma levels of TNF- α and IL-6, and reduced regulators of muscle atrophy atrogin-1 and E3 ubiquitin-protein ligase TRIM63 (MuRF-1) (Cella et al., 2020). Cr supplementation also increased hippocampal neurogenesis in mice exposed to mild chronic stress (Leem et al., 2018). It is important to highlight that, despite showing neuroprotective effects, Cr does not necessarily need to increase concentrations at different brain sites to show effects. A recent systematic review that evaluated the effects of Cr supplementation on neuroprotection after perinatal asphyxia in preclinical studies found positive effects without increases in brain concentrations. They reported that this may be associated with effects on smooth muscle cells and/or vascular endothelium, in addition to anti-inflammatory properties (Tran et al., 2021). In a study with triathletes, Cr supplementation was able to reduce plasma levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , INF- α , IL-1 β), as well as levels of prostaglandin E2 (PGE2) (Bassit et al., 2008). Although there are studies with Cr supplementation in muscle wasting diseases, studies with CP are needed.

We propose to evaluate the peripheral levels of inflammatory markers in experimental models of CP. Given that the experimental models present damages that are very similar to those observed in humans, we believe that the animals will present peripheral inflammation, as observed in the studies with humans cited above. Since

there are no studies in humans showing the levels of inflammatory markers in specific areas of the brain, we also suggest this evaluation. Furthermore, we propose to evaluate the effects of substances with anti-inflammatory potential, such as Cr, on impairments observed in CP. Figure 1 summarizes what has already been studied and what we propose.

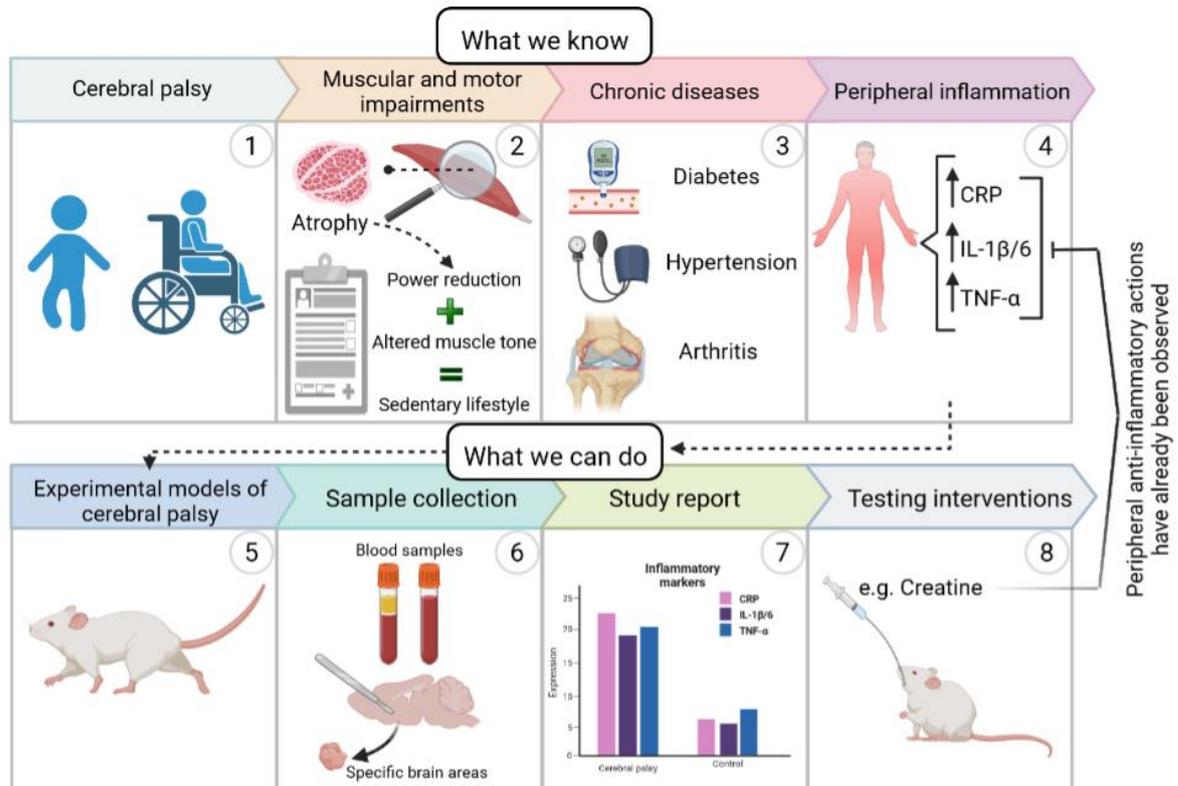


Fig. 1 Schematic illustration of what is already known about the inflammatory state in CP and what can still be investigated with the use of experimental models.

2. Conclusion

Due to the pro-inflammatory nature of the condition, we argue that the assessment of the peripheral and central inflammatory profile in experimental model of CP is key to further testing intervention with anti-inflammatory agents aiming for clinical benefits for people with CP. Cr is an exciting possibility, as it can act as an anti-inflammatory but also stimulate anabolic processes. In conclusion, results obtained may contribute to the quality of therapeutic strategies offered to children suffering from CP, the most common cause of chronic motor disability in childhood.

Acknowledgment

Graphical Abstract was created with BioRender.com.

Funding statement

We are thankful to the “Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE)” [grant number: IBPG-0176-4.05/19]. The funding source was not involved in the preparation of the manuscript.

Conflict of Interest

None.

Author contributions

H.J.C.B.G: Writing - Original Draft and Visualization. **R.M.-C:** Conceptualization and Supervision. **D.C.L:** Writing - Review & Editing. **A.E.T:** Conceptualization and Supervision.

References

- Ali, M. A., & Kravitz, A. V. (2018). Challenges in quantifying food intake in rodents. *Brain Research, 1693*(Pt B), 188–191. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.02.040>
- Antonio, J., Candow, D. G., Forbes, S. C., Gualano, B., Jagim, A. R., Kreider, R. B., Rawson, E. S., Smith-Ryan, A. E., VanDusseldorp, T. A., Willoughby, D. S., & Ziegenfuss, T. N. (2021). Common questions and misconceptions about creatine supplementation: what does the scientific evidence really show? *Journal of the International Society of Sports Nutrition, 18*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12970-021-00412-w>
- Aoki, M. S., Lima, W. P., Miyabara, E. H., Gouveia, C. H. A., & Moriscot, A. S. (2004). Deleterious effects of immobilization upon rat skeletal muscle: Role of creatine supplementation. *Clinical Nutrition, 23*(5), 1176–1183. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2004.03.004>
- Bassit, R. A., Curi, R., & Costa Rosa, L. F. B. P. (2008). Creatine supplementation reduces plasma levels of pro-inflammatory cytokines and PGE2 after a half-ironman competition. *Amino Acids, 35*(2), 425–431. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0582-4>
- Bax, M., Goldstein, M., Rosenbaun, P., Leviton, A., Paneth, N., Dan, B., Jacobsson, B., & Damiano, D. (2005). Proposed definition and classification of cerebral palsy, April

2005. *Developmental Medicine and Child Neurology*, 47(8), 571. <https://doi.org/10.1017/S001216220500112X>
- Baxter, P., Morris, C., Rosenbaum, P., Paneth, N., Leviton, A., Goldstein, M., Bax, M., Colver, A., Damiano, D., Graham, H. K., Brien, G. O., & Shea, T. M. O. (2007). The Definition and Classification of Cerebral Palsy. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 49, 1–44. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8749.2007.00001.x>
- Bender, A., Auer, D. P., Merl, T., Reilmann, R., Saemann, P., Yassouridis, A., Bender, J., Weindl, A., Dose, M., Gasser, T., & Klopstock, T. (2005). Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. *Journal of Neurology*, 252(1), 36–41. <https://doi.org/10.1007/s00415-005-0595-4>
- Butchbach, M. E. R. R., Edwards, J. D., Schussler, K. R., & Burghes, A. H. M. M. (2008). A novel method for oral delivery of drug compounds to the neonatal SMN Δ 7 mouse model of spinal muscular atrophy. *Journal of Neuroscience Methods*, 161(1), 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2006.11.002.A>
- Campos-Ferraz, P. L., Gualano, B., das Neves, W., Andrade, I. T., Hangai, I., Pereira, R. T. S., Bezerra, R. N., Deminice, R., Seelaender, M., & Lancha, A. H. (2016). Exploratory studies of the potential anti-cancer effects of creatine. *Amino Acids*, 48(8), 1993–2001. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2180-9>
- Canu, M. H., & Falempin, M. (1998). Effect of hindlimb unloading on interlimb coordination during treadmill locomotion in the rat. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 78(6), 509–515. <https://doi.org/10.1007/s004210050453>
- Cella, P. S., Marinello, P. C., Borges, F. H., Ribeiro, D. F., Chimin, P., Testa, M. T. J., Guirro, P. B., Duarte, J. A., Cecchini, R., Guarnier, F. A., & Deminice, R. (2020). Creatine supplementation in Walker-256 tumor-bearing rats prevents skeletal muscle atrophy by attenuating systemic inflammation and protein degradation signaling. *European Journal of Nutrition*, 59(2), 661–669. <https://doi.org/10.1007/s00394-019-01933-6>
- Cho, J. W., Jung, S. Y., Kim, D. Y., Chung, Y. R., Choi, H. H., Jeon, J. W., & Han, J. H. (2018). PI3K-Akt-Wnt pathway is implicated in exercise-induced improvement of short-term memory in cerebral palsy rats. *International Neurology Journal*, 22, S156–S164. <https://doi.org/10.5213/inj.1836224.112>

- Clowry, G. J., Basuodan, R., & Chan, F. (2014). What are the best animal models for testing early intervention in cerebral palsy? *Frontiers in Neurology*, 5(DEC), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00258>
- Colver, A., Fairhurst, C., & Pharoah, P. O. D. (2014). Cerebral palsy. *The Lancet*, 383(9924), 1240–1249. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61835-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61835-8)
- Coq, J. O., Strata, F., Russier, M., Safadi, F. F., Merzenich, M. M., Byl, N. N., & Barbe, M. F. (2008). Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: Implications for cerebral palsy. *Experimental Neurology*, 210(1), 95–108. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.006>
- Delcour, M., Massicotte, V. S., Russier, M., Bras, H., Peyronnet, J., Canu, M. H., Cayetanot, F., Barbe, M. F., & Coq, J. O. (2018). Early movement restriction leads to enduring disorders in muscle and locomotion. *Brain Pathology*, 28(6), 889–901. <https://doi.org/10.1111/bpa.12594>
- Delcour, M., Russier, M., Castets, F., Turle-Lorenzo, N., Canu, M. H., Cayetanot, F., Barbe, M. F., & Coq, J. O. (2018). Early movement restriction leads to maladaptive plasticity in the sensorimotor cortex and to movement disorders. *Scientific Reports*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34312-y>
- Deldicque, L., Theisen, D., Bertrand, L., Hespe, P., Hue, L., & Francaux, M. (2007). Creatine enhances differentiation of myogenic C2C12 cells by activating both p38 and Akt/PKB pathways. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 293(4). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00162.2007>
- Diz-Chaves, Y., Pernía, O., Carrero, P., & Garcia-Segura, L. M. (2012). Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *Journal of Neuroinflammation*, 9, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-71>
- Dolan, E., Gualano, B., & Rawson, E. S. (2019). Beyond muscle: the effects of creatine supplementation on brain creatine, cognitive processing, and traumatic brain injury. *European Journal of Sport Science*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1080/17461391.2018.1500644>
- du Sert, N. P., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lazic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., ...

- Würbel, H. (2020). The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biology*, 18(7), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>
- Ekdahl, C. T. (2012). Microglial activation-tuning and pruning adult neurogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, 3 MAR(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00041>
- Fragopoulou, A. F., Qian, Y., Hejtz, R. D., & Forssberg, H. (2019). Can Neonatal Systemic Inflammation and Hypoxia Yield a Cerebral Palsy-Like Phenotype in Periadolescent Mice? *Molecular Neurobiology*, 56(10), 6883–6900. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1548-8>
- Galbraith, R. A., Furukawa, M., & Li, M. (2006). Possible role of creatine concentrations in the brain in regulating appetite and weight. *Brain Research*, 1101(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.05.032>
- Genius, J., Geiger, J., Bender, A., Möller, H. J., Klopstock, T., & Rujescu, D. (2012). Creatine protects against excitotoxicity in an in vitro model of neurodegeneration. *PLoS ONE*, 7(2), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030554>
- Guimarães-Ferreira, L., Pinheiro, C. H. J., Gerlinger-Romero, F., Vitzel, K. F., Nachbar, R. T., Curi, R., & Nunes, M. T. (2012). Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, 112(11), 3905–3911. <https://doi.org/10.1007/s00421-012-2378-9>
- Hall, M., & Trojian, T. H. (2013). Creatine supplementation. *Current Sports Medicine Reports*, 12(4), 240–244. <https://doi.org/10.1249/JSR.0b013e31829cdf2>
- Herold, S., Kumar, P., Jung, K., Graf, I., Menkhoff, H., Schulz, X., Bähr, M., & Hein, K. (2016). CatWalk gait analysis in a rat model of multiple sclerosis. *BMC Neuroscience*, 17(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12868-016-0317-0>
- Hespeel, P., Op, B., Leemputte, M. Van, Ursø, B., Greenhaff, P. L., Labarque, V., Dymarkowski, S., Hecke, P. Van, & Richter, E. A. (2001). *Muscle disuse due to physical inactivity*. 625–633.
- Himmelman, K. (2013). Epidemiology of cerebral palsy. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 111). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52891-9.00015-4>

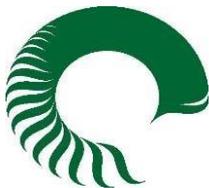
- Iosif, R. E., Ekdahl, C. T., Ahlenius, H., Pronk, C. J. H., Bonde, S., Kokaia, Z., Jacobsen, S. E. W., & Lindvall, O. (2006). Tumor necrosis factor receptor 1 is a negative regulator of progenitor proliferation in adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, *26*(38), 9703–9712. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2723-06.2006>
- Kim, E. J., Pellman, B., & Kim, J. J. (2015). Stress effects on the hippocampus: A critical review. *Learning and Memory*, *22*(9), 411–416. <https://doi.org/10.1101/lm.037291.114>
- Kreider, R. B., Kalman, D. S., Antonio, J., Ziegenfuss, T. N., Wildman, R., Collins, R., Candow, D. G., Kleiner, S. M., Almada, A. L., & Lopez, H. L. (2017). International Society of Sports Nutrition position stand: Safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport, and medicine. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *14*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12970-017-0173-z>
- Krick, J., & Duyn, M. A. Van. (1984). The relationship between oral-motor involvement and growth: a pilot study in a pediatric population with cerebral palsy. *J Am Diet Assoc*, *84*(5), 555–559.
- Krigger, K. W. (2006). Cerebral Palsy: An Overview. *American Family Physician*, *73*(1), 91–100.
- Lacerda, D. C., Ferraz-Pereira, K. N., Visco, D. B., Pontes, P. B., Chaves, W. F., Guzman-Quevedo, O., Manhães-de-Castro, R., & Toscano, A. E. (2017). Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats. *Physiology and Behavior*, *173*, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.043>
- Lacerda, D. C., Manhães-de-Castro, R., Gouveia, H. J. C. B., Tourneur, Y., Costa de Santana, B. J., Assunção Santos, R. E., Olivier-Coq, J., Ferraz-Pereira, K. N., & Toscano, A. E. (2019). Treatment with the essential amino acid L-tryptophan reduces masticatory impairments in experimental cerebral palsy. *Nutritional Neuroscience*, *0*(0), 1–13. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2019.1695360>
- Lawler, J. M., Barnes, W. S., Wu, G., Song, W., & Demaree, S. (2002). Direct antioxidant properties of creatine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *290*(1), 47–52. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6164>
- Leem, Y.-H., Kato, M., & Chang, H. (2018). Regular exercise and creatine supplementation prevent chronic mild stress-induced decrease in hippocampal

- neurogenesis via Wnt/GSK3 β / β -catenin pathway. *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*, 22(2), 1–6. <https://doi.org/10.20463/jenb.2018.0009>
- Magalhães, R. C., Moreira, J. M., Lauar, A. O., da Silva, A. A. S., Teixeira, A. L., & e Silva, A. C. S. (2019). Inflammatory biomarkers in children with cerebral palsy: A systematic review. *Research in Developmental Disabilities*, 95(September). <https://doi.org/10.1016/j.ridd.2019.103508>
- Matthews, R. T., Yang, L., Jenkins, B. G., Ferrante, R. J., Rosen, B. R., Kaddurah-Daouk, R., & Beal, M. F. (1998). Neuroprotective effects of creatine and cyclocreatine in animal models of Huntington's disease. *Journal of Neuroscience*, 18(1), 156–163. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-01-00156.1998>
- Monje, M. L., Toda, H., & Palmer, T. D. (2003). Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science*, 302(5651), 1760–1765. <https://doi.org/10.1126/science.1088417>
- Murai, I. H., Roschel, H., Pabis, L. V. S., Takayama, L., de Oliveira, R. B., dos Santos Pereira, R. T., Dantas, W. S., Pereira, R. M. R., Jorgetti, V., Ballester, R. Y., & Gualano, B. (2015). Exercise training, creatine supplementation, and bone health in ovariectomized rats. *Osteoporosis International*, 26(4), 1395–1404. <https://doi.org/10.1007/s00198-014-3017-6>
- Pereira, S. da C., Benoit, B., de Aguiar Junior, F. C. A., Chanon, S., Vieille-Marchiset, A., Pesenti, S., Ruzzin, J., Vidal, H., & Toscano, A. E. (2021). Fibroblast growth factor 19 as a countermeasure to muscle and locomotion dysfunctions in experimental cerebral palsy. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 12(6), 2122–2133. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12819>
- Peterson, M. D., Ryan, J. M., Hurvitz, E. A., & Mahmoudi, E. (2015). Chronic conditions in adults with cerebral palsy. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 314(21), 2303–2305. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.11025>
- Phillips, S. M., Glover, E. I., & Rennie, M. J. (2009). Alterations of protein turnover underlying disuse atrophy in human skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 107(3), 645–654. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00452.2009>
- Pingel, J., Barber, L., Andersen, I. T., Walden, F. Von, Wong, C., Døssing, S., & Nielsen, J. B. (2019). Systemic inflammatory markers in individuals with cerebral palsy. *European Journal of Inflammation*, 17. <https://doi.org/10.1177/2058739218823474>

- Roque, A., Ochoa-Zarzosa, A., & Torner, L. (2016). Maternal separation activates microglial cells and induces an inflammatory response in the hippocampus of male rat pups, independently of hypothalamic and peripheral cytokine levels. *Brain, Behavior, and Immunity*, *55*, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.09.017>
- Rumajogee, P., Bregman, T., Miller, S. P., Yager, J. Y., & Fehlings, M. G. (2016). Rodent hypoxia-ischemia models for cerebral palsy research: A systematic review. *Frontiers in Neurology*, *7*(APR). <https://doi.org/10.3389/fneur.2016.00057>
- Saavedra, L. M., Hernández-Velázquez, M. G., Madrigal, S., Ochoa-Zarzosa, A., & Torner, L. (2021). Long-term activation of hippocampal glial cells and altered emotional behavior in male and female adult rats after different neonatal stressors. *Psychoneuroendocrinology*, *126*(February). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2021.105164>
- Safdar, A., Yardley, N. J., Snow, R., Melov, S., & Tarnopolsky, M. A. (2008). Global and targeted gene expression and protein content in skeletal muscle of young men following short-term creatine monohydrate supplementation. *Physiological Genomics*, *32*(2), 219–228. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00157.2007>
- Sakkas, G. K., Schambelan, M., & Mulligan, K. (2009). Can the use of creatine supplementation attenuate muscle loss in cachexia and wasting? *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, *12*(6), 623–627. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328331de63>
- Silva, K. O. G. da, Pereira, S. da C., Portovedo, M., Milanski, M., Galindo, L. C. M., Guzmán-Quevedo, O., Manhães-de-Castro, R., & Toscano, A. E. (2016). Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *52*, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.05.002>
- Strata, F., Coq, J. O., Byl, N., & Merzenich, M. M. (2004). Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: Implications for a rodent model of cerebral palsy. *Neuroscience*, *129*(1), 141–156. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.024>
- Takeshita, H., Yamamoto, K., Nozato, S., Inagaki, T., Tsuchimochi, H., Shirai, M., Yamamoto, R., Imaizumi, Y., Hongyo, K., Yokoyama, S., Takeda, M., Oguro, R., Takami, Y., Itoh, N., Takeya, Y., Sugimoto, K., Fukada, S. I., & Rakugi, H. (2017). Modified forelimb grip strength test detects aging-associated physiological decline

- in skeletal muscle function in male mice. *Scientific Reports*, 7(November 2015), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep42323>
- Tran, N. T., Kelly, S. B., Snow, R. J., Walker, D. W., Ellery, S. J., & Galinsky, R. (2021). Assessing creatine supplementation for neuroprotection against perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy: A systematic review of perinatal and adult pre-clinical studies. *Cells*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/cells10112902>
- Verschuren, O., Smorenburg, A. R. P., Luiking, Y., Bell, K., Barber, L., & Peterson, M. D. (2018). Determinants of muscle preservation in individuals with cerebral palsy across the lifespan: a narrative review of the literature. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 9(3), 453–464. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12287>
- Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., & Eppenberger, H. M. (1992). Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: The “phosphocreatine circuit” for cellular energy homeostasis. *Biochemical Journal*, 281(1), 21–40. <https://doi.org/10.1042/bj2810021>
- Willoughby, D. S., & Rosene, J. M. (2003). Effects of oral creatine and resistance training on myogenic regulatory factor expression. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 35(6), 923–929. <https://doi.org/10.1249/01.MSS.0000069746.05241.F0>
- Yirmiya, R., & Goshen, I. (2011). Immune modulation of learning, memory, neural plasticity and neurogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(2), 181–213. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.015>

ANEXO A - Comitê de ética



Universidade Federal de Pernambuco

Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n 50670-420 /

Recife – PE – Brasil Fones: 2126 8842

ceua@ufpe.br

Recife, 02 de setembro de 2019

Ofício nº 53/19

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

Para: **Prof. Raul Manhães de Castro**

Departamento de Nutrição

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **0019/2019**

Certificamos que a proposta intitulada **“Suplementação com creatina e treinamento resistido: estudo do desenvolvimento neuro-músculo-esquelético em un modelo de paralisia cerebral em ratos adolescentes”**. registrado com o nº **0019/2019** sob a responsabilidade de **Prof. Raul Manhães de Castro** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 27/08/2019

Finalidade) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Agosto de 2019 a fevereiro de 2023
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogenico
Nº de animais	Progenitores: 15 machos e 30 fêmeas/ filhotes: 120 machos. total = 165
Peso/Idade	Progenitores; 220a 250g/90a 120 dias Filhotes: 5 a 80g/ 1 a 62 dias
Sexo	Fêmea (30) Macho (130)
Origem: Biotério de Criação	Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Nutrição da UFPE.

Atenciosamente,



Prof. Sebastião R. F. Silva



Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691