



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

FERNANDO GABRIEL DA ROCHA CAMPOS

**EFEITOS DA VITAMINA D SOBRE A LOCOMOÇÃO, FORÇA E FIBRAS
MUSCULARES DO SÓLEO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE
PARALISIA CEREBRAL**

RECIFE
2024

FERNANDO GABRIEL DA ROCHA CAMPOS

**EFEITOS DA VITAMINA D SOBRE A LOCOMOÇÃO, FORÇA E FIBRAS
MUSCULARES DO SÓLEO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE
PARALISIA CEREBRAL**

Trabalho de Conclusão de Curso II realizado
no Departamento de Fisioterapia, em parceria
com a Unidade de Estudos em Nutrição e
Plasticidade Fenotípica, do Centro de
Ciências da Saúde- UFPE.

ORIENTADORA: Prof^{fa}. Dr^a. ANA ELISA TOSCANO MENESES DA SILVA CASTRO

COORIENTADORA: M.a. MÁRCIA MARIA DA SILVA

RECIFE

2024

Trabalho de Conclusão de Curso redigido em forma de artigo científico, que foi elaborado seguindo as normas da Revista Biomedicine & Pharmacotherapy (qualis A1 na área 21/CAPES, fator de impacto 6.9).

Artigo original- EFEITOS DA VITAMINA D SOBRE A LOCOMOÇÃO, FORÇA E FIBRAS MUSCULARES DO SÓLEO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE PARALISIA CEREBRAL

EFEITOS DA VITAMINA D SOBRE A LOCOMOÇÃO, FORÇA E FIBRAS MUSCULARES DO SÓLEO DE RATOS SUBMETIDOS A UM MODELO DE PARALISIA CEREBRAL

Fernando Gabriel da Rocha Campos^{a,b}, Márcia Maria da Silva^{b,c}, Ana Elisa Toscano^{b,c,d}

^aDepartamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

^bUnidade de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

^cPrograma de Pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

^dDepartamento de Enfermagem, CAV, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão-PE, Brasil

***Correspondência:** Ana Elisa Toscano

Ana Elisa Toscano, Departamento de Enfermagem, CAV, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista, 55608-680 – Vitória de Santo Antão - PE, Brasil. Telefone: +55 (081) 35233351. Orcid ID: <https://orcid.org/0000-0002-7216-6523> Email: aeltoscano@yahoo.com.br

Resumo

A paralisia cerebral (PC) consiste em um distúrbio não progressivo, que resulta de danos no cérebro em desenvolvimento, afetando a coordenação motora, a postura, o tônus muscular e os movimentos. Sabe-se que a vitamina D (Vit D) é conhecida por seu papel na homeostasia do cálcio e metabolismo ósseo, também tem implicações na função neuromuscular e neuroproteção, o que a torna um potencial agente terapêutico para síndromes neurológicas. O presente estudo teve por objetivo avaliar as repercussões do tratamento neonatal com VitD sobre a locomoção, força e músculo esquelético de ratos machos submetidos a PC. Utilizou-se modelo de PC que associa anóxia utilizando-se de um fluxo de nitrogênio (100%), 9L/min por 12 minutos no P0 e P1, associada a restrição sensorio motora durante 16 horas/dia (P2 ao P29), e a manipulação farmacológica (Vit.D ou veículo), foi administrada por via intraperitoneal do P2 ao 30. Com relação aos impactos da PC no

modelo, foram observadas alterações na atividade locomotora, com redução da distância percorrida; velocidade máxima; velocidade média e aumento do tempo de imobilidade e episódios imóveis. No quesito força foi observada uma redução significativa no grupo PC e na contagem de fibras musculares não foram encontradas alterações significativas. Com relação aos grupos tratados com VitD, foram observados efeitos na distância percorrida; velocidade média e máxima; tempo de imobilidade e menor número de episódios imóveis, além de atuar no ganho de força. No entanto, a análise das fibras musculares não revelou diferenças significativas entre os tipos de fibras (I e II) nos grupos tratados. Portanto, esses achados sugerem que a VitD pode ter efeitos terapêuticos benéficos na função locomotora e força muscular em modelos experimentais de paralisia cerebral.

Palavras-chave: Paralisia cerebral; Modelos animais; Vitamina D; Locomoção; Força muscular; Fibras musculares.

1. INTRODUÇÃO

O fenótipo é a junção do conjunto de genes e das influências exercidas pelo meio ambiente no qual o organismo está inserido. Dessa forma, a plasticidade fenotípica é a capacidade que um determinado organismo tem de apresentar diferentes características devido às condições ambientais onde está inserido (Lima, 2017). A partir dessa plasticidade é possível haver alterações em nível celular, fisiológico e até mesmo morfológico (West-Eberhard, 1986). Sendo assim, foi observado que os impactos de alterações precoces no fenótipo causam alterações metabólicas que podem levar a consequências durante toda a vida do indivíduo (Hales, 1991). Portanto, o período perinatal representa um período de grande plasticidade para o futuro neonato, e com isso, um momento oportuno para se analisar os mecanismos adaptativos relacionados às diversas síndromes ou distúrbios do desenvolvimento, como, por exemplo, a paralisia cerebral (PC) (Hales, 1991).

A PC consiste em um quadro de desordens permanentes, não progressivas, que afetam o desenvolvimento locomotor, de movimento e a postura, levando a uma limitação de atividades, que ocorreram no desenvolvimento do indivíduo nas fases iniciais da vida (Rosenbaum et al., 2007), devido insulto ou má formação do cérebro em desenvolvimento (Rosenbaum, 2006). A PC, é uma síndrome complexa caracterizada por alterações neurológicas permanentes que afetam o desenvolvimento motor e cognitivo, podendo limitar a atividade do indivíduo acometido, prejudicando sua atividade e participação social; podendo ser classificada através de escalas, como a Gross Motor Function Classification System (GMFCS) (PALISANO et al., 1997).

Apresentando uma prevalência atual de 1,5 a 1,6 por 1000 crianças nascidas vivas, em países desenvolvidos, mas, quando se trata de países com baixa ou média renda, os dados revelam uma incidência de 3,3 a 3,7 por 1000 crianças nascidas vivas (McIntyre, 2022), se tornando um preditor para uma informação acerca da precarização dos sistemas de saúde em países subdesenvolvidos (McIntyre; et al., 2022). Já no que se refere ao Brasil, um país em desenvolvimento, a prevalência é de 7 a cada 1000 crianças nascidas vivas, sendo assim, um dado que pode caracterizar a PC como um dos maiores distúrbios que gera incapacidade nas fases iniciais da vida (ZANINI; CEMIN; PERALLES, 2009; FONSECA, 2011).

. A vitamina D (VitD) embora nomeada como vitamina, é conceituada como um pró-hormônio (seco-esteróide), produzido pela pele ao ser exposta à luz ultravioleta ou ainda pode ser obtida através da dieta (Morello, 2018). Desempenhando papel fundamental na homeostasia do cálcio, no metabolismo ósseo e muscular, além de atuar na imunidade (Giudici, 2018). Além disso, estudos recentes mostram que além de seus papéis bem estabelecidos no metabolismo ósseo e na imunidade, o estado de concentração da VitD está inversamente associado à incidência de diversas doenças como cânceres, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (Perng, 2017).

Estudos em animais mostraram a ação da vitamina D no transporte ativo do cálcio para o interior do retículo sarcoplasmático de coelhos. No qual, devido uma deficiência de vitamina D, este transporte encontra-se reduzido e se normaliza com o pré-tratamento com vitamina D (Curry, 1974). Em adição a esses estudos, outro trabalho relacionou os efeitos da vitamina D na célula muscular esquelética, mostrando uma relação com o metabolismo e a síntese proteica (Birge, 1975. Pointon, 1979). Observando que a adição de calcitriol em cultura de tecido de músculo de ratos deficientes aumentou tanto o conteúdo intracelular de ATP, quanto a síntese proteica (Birge, 1975), e em músculo de coelhos raquíticos o conteúdo de troponina C, uma proteína do complexo actinmiosina com alta afinidade pelo cálcio, encontrava-se diminuído quando comparado ao músculo de animais normais (Pointon, 1979).

Ademais, estudos sobre a vitamina D mostraram sua ação na cinética da contração muscular, sua função na ativação do músculo. Nesse sentido, foi observado o prolongamento da fase de relaxamento do músculo de ratos deficientes em vitamina D, mostrando assim que a deficiência de vitamina D pode produzir uma redução do transporte ativo de cálcio para o interior do RS, processo fundamental para o relaxamento muscular (Curry, 1974. Bolland, 1983. Rodman, 1978).

Assim, percebe-se que a deficiência de VitD pode desencadear desfechos negativos na saúde dos indivíduos acometidos por síndromes neurológicas, como a PC, pois ela é essencial para o crescimento dos ossos, biomineralização e desenvolvimento

musculoesquelético geral na infância, por facilitar a absorção de cálcio e fosfato alimentar (Taylor, 2020). Sendo assim, a suplementação e aplicação farmacológica de VitD possui grande potencial no tratamento das sequelas de disfunções neurológicas, como a PC, devido seu processo de imunomodulação; neuroproteção e neurotransmissão (Cui, 2017).

Sendo assim, para um melhor entendimento e busca de soluções terapêuticas para a PC, são importantes estudos em modelos experimentais que combinem a anóxia pós-natal e restrição dos membros inferiores, para indução de um modelo de PC e estudar os mecanismos terapêuticos para minimização das sequelas neurológicas ocorridas pelo distúrbio (Coq et al., 2008. Lacerda et al., 2017). Portanto, este estudo pretende avaliar o papel da administração neonatal de VitD sobre a locomoção e o sistema muscular de ratos submetidos a um modelo de paralisia cerebral experimental.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais e modelos experimentais

Foram utilizados 48 machos da linhagem Wistar, provenientes da colônia do Biotério de criação do Departamento de Nutrição. (temperatura de 22 ± 2 °C), ciclo claro-escuro de 12/12 horas e livre acesso à água e alimentação padrão do biotério. Após a confirmação da gestação as fêmeas foram alojadas em gaiolas individuais. Após o nascimento os filhotes foram ajustados para oito filhotes por ninhada, com peso entre 6-8 gramas no primeiro dia pós-natal, permanecendo com suas respectivas genitoras durante o período de lactação, sendo aleatoriamente distribuídos nos subgrupos: a) Controle + Veículo (CV; n= 12), b) Controle + Vitamina D (CVitD; n= 12), c) Paralisia Cerebral + Veículo (PCV; n= 12), d) Paralisia Cerebral + Vitamina D (PCVitD; n= 12), . Após o desmame (P25), os animais foram separados em gaiolas individuais (3-4 animais por gaiola) até P60, quando foram eutanasiados para coleta de tecidos. Este projeto seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal, bem como as normas internacionais estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals* e foi submetido à Comissão de Ética em Uso Animal da UFPE e iniciado após aprovação (Processo n° 104/2021, Ofício n° 21/22).

2.2. Modelo experimental de paralisia cerebral

Os filhotes dos grupos PC foram submetidos ao modelo experimental de PC adaptado por Coq et al., (2008) e Lacerda et al. (2017). Este modelo associa a anóxia perinatal a um modelo de restrição sensório-motora dos membros inferiores semelhante à falta de movimento que ocorre na PC, com hiperextensão dos membros posteriores. Ao nascerem, os filhotes foram submetidos a dois episódios de anóxia, no qual os animais eram expostos a

nitrogênio dentro de uma câmara vedada, no P0 (dia do nascimento) e P1 (dia um de vida pós-natal). Do P2 ao P28 foi realizada a restrição sensório-motora das patas posteriores usando fita micropore, esparadrapo e molde feito de époxi durante 16 horas por dia e nas demais 8 horas do dia a livre movimentação dos animais era permitida. As órteses eram inseridas de modo a não interferir nos cuidados maternos, na alimentação e na eliminação de fezes e urina (Coq; et Al., 2008; Silva; et al., 2016; Strata et al., 2004b).

2.3. Administração neonatal de Vit.D ou solução veículo

A Vitamina D foi aplicada conforme protocolo adaptado de Mehri e colaboradores (2020). Os filhotes receberam o tratamento com Vitamina D (Cholecalciferol-Sigma-Aldrich, USA) na dose de 5µg/kg/dia, dissolvida no Veículo (água destilada e monolaurato de polioxietileno sorbitano). Os filhotes dos grupos Vit.D ou Veículo receberam o tratamento durante o período do P2 ao P30 de dias de vida pós-natal, via intraperitoneal; logo após a retirada da restrição sensório-motora.

2.4. Análises experimentais

2.4.1. Atividade locomotora

No P8, P14, P17, P21, P30 e P59 foi avaliada a atividade locomotora, através do software Anymaze em campo aberto. A livre movimentação de cada animal foi registrada no campo aberto durante 5 minutos. Os parâmetros analisados foram: distância total (m), velocidade média (m/s), velocidade máxima (m/s), tempo de imobilidade (s) e episódios imóveis (n) (Silva, 2016).

2.4.2. Força muscular

No P30 e P59, houve a mensuração da força máxima de preensão antes da liberação da garra, que foi registrada por um dinamômetro digital (Grip Strength). As patas anteriores dos animais foram posicionadas na barra de apoio do Grip na vertical e puxados para baixo de forma lenta e contínua até os animais soltarem. Sendo registradas 3 tentativas para cada animal, com intervalos de descanso entre cada um, onde posteriormente uma média foi calculada (Kgf).

2.4.3. Análise dos tipos de fibras musculares do músculo sóleo

Após o sacrifício por decaptação no P60, o músculo sóleo foi retirado, pesado e após a pesagem, o músculo foi congelado em n-hexano (Pré-resfriado a -78,5°C) e armazenado a -80°C. Foram realizadas secções transversais (8µm), por meio do criostato a -30°C, do músculo sóleo. As secções foram fixadas em lâminas e o procedimento de coloração pela técnica de ATPase miofibrilar ocorreu depois de atingir a temperatura ambiente (Brooke; Kaiser, 1970; Lacerda et al., 2017b). As fibras musculares foram coradas em relação aos dois

tipos de fibras principais (I, IIa), de acordo com as diferenças na intensidade da coloração ATPase após pré-incubação de ácido (pH 4.3). Na pré-incubação com pH 4.3 as fibras foram coradas em tipo I (mais escura) e tipo II (mais clara). Os cortes obtidos foram analisados através de um microscópio óptico (Olympus BX-41, 100x) conectado a um computador com software de captura de imagem Analysis Get It. Todas as fibras musculares foram contadas em cada secção histológica, sendo os valores apresentados para os diferentes tipos de fibras como uma percentagem do número total. Para realizar a contagem das fibras foi utilizado o software ImageJ (versão 1.51p).

2.5. Análise estatística dos resultados

Os dados obtidos foram inicialmente analisados quanto à distribuição normal (teste de Kolmogorov-Sminorv). Constatada normalidade, foram realizados os testes paramétricos (Anovas). Não sendo observada distribuição normal, foram adotados testes estatísticos não paramétricos (Kruskal Wallis e Friedman). Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão ou como mediana e valores máximos e mínimos, com nível de significância de 5% e foi utilizado o software GraphPadPrism® 6 para as análises.

3. RESULTADOS

3.1. Desenvolvimento da atividade locomotora

Com relação aos parâmetros do desenvolvimento da atividade locomotora em campo aberto (figura 1), foram observadas diferenças significativas nos parâmetros de distância [$F(3, 36) = 37,88$; $P < 0,0001$], velocidade média [$F(3, 36) = 46,81$; $P < 0,0001$], velocidade máxima [$F(3, 36) = 51,15$; $P < 0,0001$], tempo de imobilidade [$F(3, 36) = 17,70$; $P < 0,0001$] e número de episódios imóveis [$F(3, 36) = 18,61$; $P < 0,0001$].

Diferenças significantes entre os grupos no parâmetro de distância percorrida foram observadas, aos 14 dias, os grupos PCV e PCVitD apresentaram menor distância percorrida quando comparados aos seus respectivos controles (pós-teste de Tukey $p < 0,005$; figura 1A). Nos dias P17, P21 e P30 apenas o grupo PCV apresentou menor distância em comparação com seu controle (pós-teste de Tukey $p < 0,005$; figura 1). Com relação ao tratamento com Vit.D, aos 21 dias houve diferenças entre os grupos submetidos à PC, onde os animais que receberam apenas a Vit.D, percorreram maiores distâncias que os animais que receberam o veículo (pós-teste de Tukey $p = 0,0002$; figura 1A).

Houve diferenças também com relação ao parâmetro velocidade média dos animais no campo aberto. Nos dias P8, P14 e P30 observamos que os animais submetidos ao modelo de PC experimental apresentaram diminuição da velocidade média em comparação com os

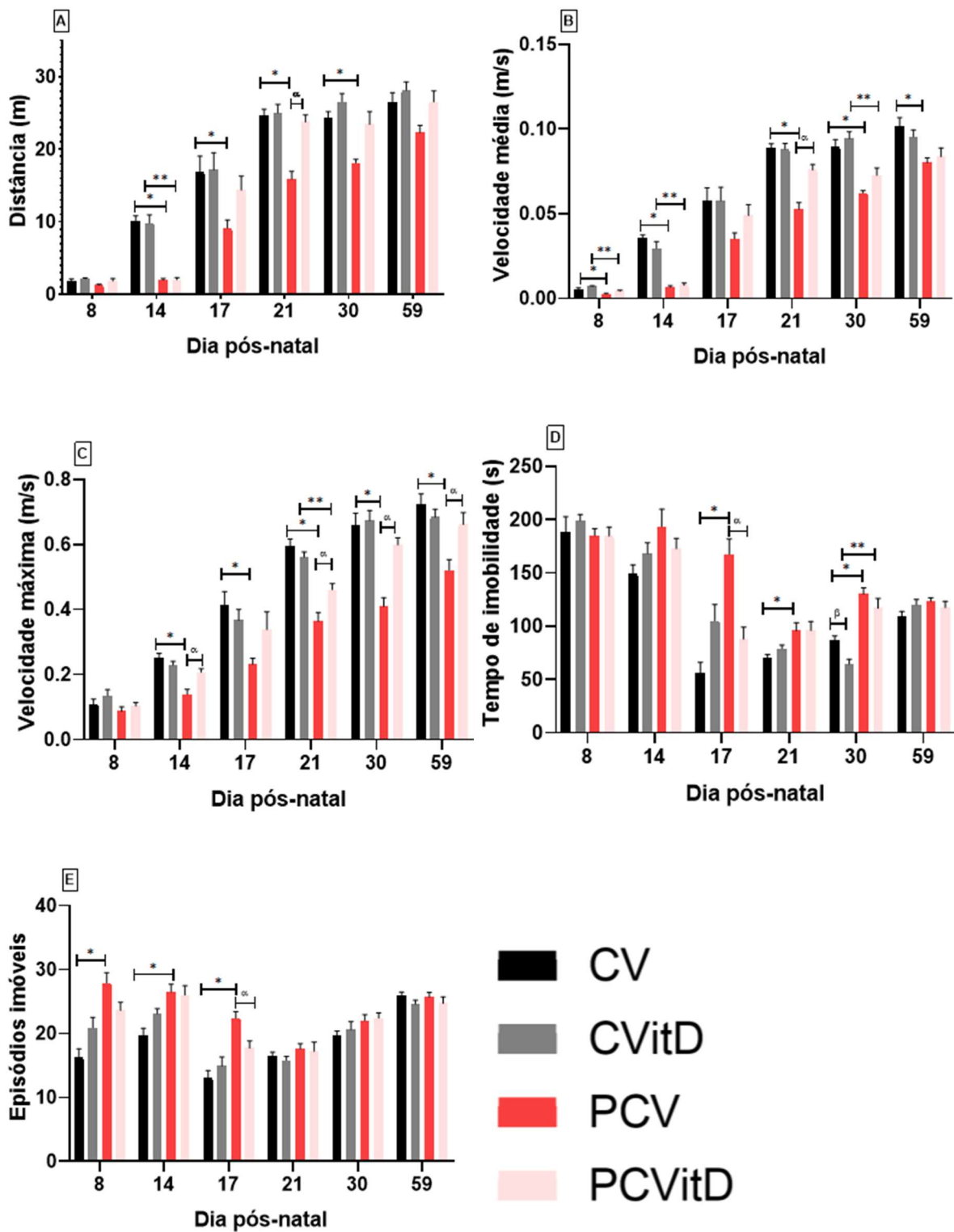
animais dos grupos controle (PCV vs. CV e PCVitD vs. CVitD; pós-teste de Tukey $p < 0,05$; figura 1B). Aos P21 e P59 dias, apenas os animais PC que receberam veículo comparado ao controle apresentaram menor velocidade média (pós-teste de Tukey $p < 0,05$; figura 1B). Com relação ao tratamento com Vit.D, aos 21 dias os animais com paralisia que foram tratados apresentaram maior velocidade média, quando comparados aos animais que receberam o veículo (pós-teste de Tukey $p = 0,0013$; figura 1B).

Com relação ao parâmetro de velocidade máxima, houve diferenças entre os animais do grupo paralisia que receberam veículo em comparação com os controles que também receberam veículo, nos dias P14, P17, P21, P30 e P59 (pós-teste de Tukey $p < 0,05$; figura 1C), os animais PC que receberam Vit.D apresentaram diferenças com os controles que também receberam a Vit.D, apenas no dia P21 (pós-teste de Tukey $p = 0,0040$; figura 1C). Os animais com PC tratados apresentaram nos dias P14, P21, P30 e P59 maior velocidade máxima comparado aos animais PC que receberam apenas a solução veículo (pós-teste de Tukey $p < 0,05$; figura 1C).

Houve diferenças também no parâmetro de tempo de imobilidade, os animais com paralisia que receberam veículo, permaneceram mais tempo parados, em comparação com os controles que também receberam veículo, nos dias P17, P21 e P30 (pós-teste de Tukey $p < 0,05$; figura 1D). Com relação ao tratamento do P2 ao P30 de dias de vida, os animais controles apresentaram diferenças entre si, onde os animais que receberam Vit.D passaram menos tempo parados em comparação com os animais que receberam veículo (pós-teste de Tukey $p = 0,0077$; figura 1D). Aos 17 dias, os animais submetidos ao modelo de paralisia experimental e receberam a Vit.D permaneceram menos tempo parados em comparação com os animais que receberam veículo (pós-teste de Tukey $p = 0,0018$; figura 1D).

Nos dias P8, P14 e P17 os animais submetidos ao modelo de PC experimental e que receberam a solução veículo, apresentaram mais episódios de imobilidade em comparação com os controles que receberam também o veículo (pós-teste de Tukey $p < 0,05$; figura 1E). E aos 17 dias houve diferença entre os animais com paralisia, os animais tratados apresentaram menos episódios imóveis em comparação com os animais que receberam apenas o veículo (pós-teste de Tukey $p = 0,0289$; figura 1E).

Figura 1. Desenvolvimento da atividade locomotora

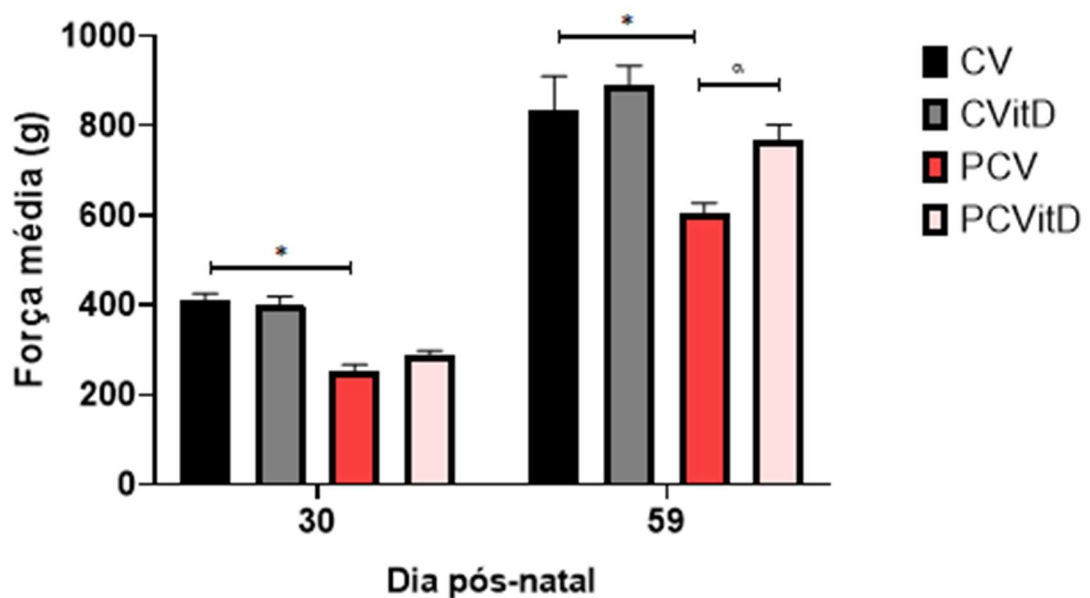


Fonte: o autor (2024). Análise da atividade locomotora dos animais no teste de campo aberto nos dias P8, P14, P17, P21, P30 e P59. Foi realizado o teste ANOVA two-way múltiplas comparações e teste post-hoc de Tukey's. A composição dos grupos está de acordo com modelo de paralisia cerebral ou controle, intervenção com vitamina D ou veículo. n por grupo = 12 * = CV vs. PCV; ** = CD vs. PCD; β = CV vs. CD; α = PCV vs. PCD.

3.2. Análise de força no *GripStrength*

Com relação a força, foi observado um efeito significativo entre os grupos na análise da força de preensão no aparelho *GripStrength* [$F(3, 44) = 14,41$; $P < 0,0001$]. O modelo experimental ocasionou diminuição da força média no P30 e P59 entre os animais que receberam apenas o veículo em comparação com o controle que recebeu veículo (pós-teste de Tukey: $p < 0,05$. Figura 2). E no P59 os animais do grupo PC que receberam tratamento com VitD apresentaram aumento desse efeito quando comparados ao grupo PCV (pós-teste de Tukey: $p = 0,0061$; figura 2).

Figura 2. Análise da força muscular no Grip Strength

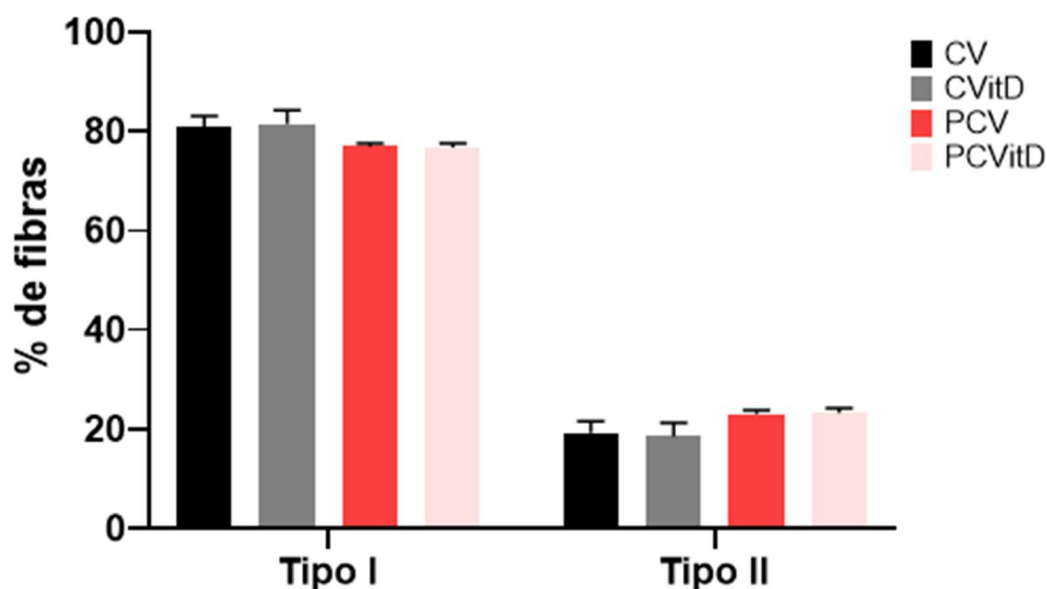


Fonte: o autor (2024). Análise da força média dos animais no Grip Strength no P30 e P60. Foi realizado o teste ANOVA two-way múltiplas comparações e teste post-hoc de Tukey's. A composição dos grupos está de acordo com modelo de paralisia cerebral ou controle, intervenção com vitamina D ou veículo. n por grupo = 12 * = CV vs. PCV; ** = CD vs. PCD; β = CV vs. CD; α = PCV vs. PCD.

3.3. Proporção dos tipos de fibras musculares

Com relação proporção dos tipos de fibras musculares (%) no músculo sóleo no pH 4.3 (figura 3) não foram observadas diferenças significativas no tipo I [$F(3, 12) = 1,487$; $P = 0,2679$], ou tipo II [$F(3, 12) = 1,487$; $P = 0,2679$]. Portanto, sem apresentar resultados significativos nesse parâmetro.

Figura 3. Análise das fibras musculares por ATPase



Fonte: o autor (2024). Análise da ATPase do músculo sóleo dos animais na contagem de fibras musculares no P60. Foi realizado o teste ANOVA two-way múltiplas comparações e teste post-hoc de Tukey's. A composição dos grupos está de acordo com modelo de paralisia cerebral ou controle, intervenção com vitamina D ou veículo. n por grupo = 12 * = CV vs. PCV; ** = CD vs. PCD; β = CV vs. CD; α = PCV vs. PCD.

4. DISCUSSÃO

A PC é uma condição neurológica que frequentemente resulta em comprometimento motor e funcional significativo, afetando a qualidade de vida dos indivíduos afetados (Rosenbaum et al., 2007). Neste contexto, a Vit.D tem sido estudada devido às suas potenciais propriedades neuroprotetoras e moduladoras sobre o desenvolvimento neuronal (Cui, 2017). Além de atuar no sistema músculo-esquelético, na melhora da contração de fibras musculares (Pedrosa, 2005). Com isso, no campo experimental, esse estudo se mostra como pioneiro, devido à escassez na literatura acerca da associação da vitamina D na redução dos impactos da PC.

O estudo avaliou os efeitos do tratamento neonatal com a VitD em ratos machos em um modelo de PC. Destacando aqui o impacto do modelo na marcha, por meio da atividade locomotora; força muscular e na preservação de fibras musculares. Com pesquisas, de um grupo de estudos parceiro dessa pesquisa, que reforçam os impactos e ações de terapias para minimizar os impactos da PC em modelos experimentais com ratos (Silva et al., 2016, Lacerda et al., 2017, Lacerda et al., 2019; Lacerda et al., 2021; Visco et al., 2022; Visco et al., 2023; Gouveia et al., 2023).

Sendo assim, sobre a atividade locomotora, no que se refere a distância percorrida, foi observado que, aos 14 dias, o grupo PCV (paralisia cerebral + veículo) percorreu uma

menor distância do que seu controle correspondente CV (controle + veículo), com essa diferença persistindo ao longo do tempo no grupo PCV. Além disso, o mesmo padrão de redução nos valores foi observado no quesito velocidade dentro da janela dos 14 dias, corroborando com estudos que mostram reduções da locomoção dentro de modelos experimentais de PC, que passaram por restrições sensório-motoras (Strata, 2004b. Costa-de-Santana; et al., 2023).

No entanto, aos 21 dias, os animais tratados com Vit.D percorreram distâncias significativamente maiores em comparação aos que receberam apenas o veículo, sugerindo um efeito positivo da Vit.D na locomoção dos animais, principalmente, com paralisia cerebral (PCVitD). Além de apresentarem um aumento significativo na velocidade de marcha, tal resultado se mostra em consonância com a literatura, no que se refere a melhora da locomoção a partir de um tratamento que possa atuar no desenvolvimento músculo-esquelético; tendo em vista a ação da Vit.D no processo de síntese proteica muscular (Pereira; et al, 2021. Bernoit; et al, 2017).

Ademais, também foram avaliados os períodos de imobilismo dos grupos. No qual foi observado que o tempo de imobilidade, um indicador de comportamento menos ativo, foi maior nos animais com PC que receberam apenas o veículo (PCV) em comparação aos controles correspondentes (CV). Tal comportamento de imobilidade também foi observado no número de episódios imóveis, no qual foi observado um maior número de episódios nos grupos PC que receberam solução veículo, sendo observado na literatura prejuízos decorrentes da PC na mobilidade dos grupos acometidos (Strata, 2004. Costa-de-Santana; et al., 2023).

Entretanto, aos 17 e 30 dias, os animais tratados com Vit.D (PCVitD) apresentaram significativamente menos tempo de imobilidade em comparação aos que receberam o veículo (PCV), indicando um potencial efeito antidepressivo ou estimulante da Vit.D nesses animais. Da mesma forma, o número de episódios imóveis foi menor nos animais com paralisia cerebral tratados com Vit.D em comparação aos que receberam o veículo particularmente aos 17 dias de idade, com informações na literatura que mostram benefícios do tratamento voltado para o sistema muscular na PC (Pereira; et al, 2021. Bernoit; et al, 2017).

A PC em modelos experimentais, como observado neste estudo em ratos, frequentemente resulta em comprometimento significativo da função motora. Com isso, o estudo avaliou a força muscular através do aparelho GripStrength. Sendo possível observar que, os animais submetidos ao modelo de PC exibiram uma redução significativa na força de preensão aos dias P30 e P59 quando comparados ao grupo controle veículo, corroborando com achados, analisando animais em idades mais avançadas, que mostram impactos no desempenho musculoesquelético em indivíduos com PC, no qual, devido ao processo de

incapacidade motora, tal distúrbio pode promover sequelas na ativação muscular (Dahlseng, 2012. Lacerda, 2017. Costa-de-Santana; et al., 2023).

No entanto, no P60, observou-se que os ratos do grupo PC tratados com Vit.D demonstraram uma atenuação desse efeito adverso em comparação com aqueles tratados com solução veículo, sugerindo um potencial efeito protetor da Vit.D na função muscular em condições de PC. Sendo possível observar em estudos que a Vit.D possui efeitos na síntese proteica e cinética da contração muscular (Pedrosa, 2005). Mostrando os benefícios da suplementação de vitamina D, destacando uma terapêutica que pode auxiliar na mitigação dos efeitos debilitantes da PC sobre a força muscular.

Sobre a análise das fibras musculares, no estudo atual os resultados mostraram que, ao nível estatístico, não houve diferenças significativas na proporção dos tipos de fibras musculares entre os grupos com PC e os controles. Embora, relatos na literatura indicam que a PC promove impactos na síntese proteica muscular, devido a deficiência de Vit.D, no qual, estudos mostram que indivíduos com PC tendem a apresentar níveis baixos de vitamina D no organismo, comprometendo alguns sistemas como o sistema neuromuscular (Seth. et al., 2017).

A partir do exposto, a falta de diferença estatisticamente significativa no atual estudo pode indicar que devido ao tempo de 32 dias sem constante restrição sensório-motora e 39 sem suplementação de Vit.D, os animais podem ter apresentado uma janela de recuperação por livre mobilidade motora. Tendo em vista que alguns estudos, envolvendo modelos de PC em ratos, realizam a coleta de materiais em uma janela menor de tempo; diminuindo a possibilidade de livre recuperação muscular (Silva; et al., 2016. Pereira; et al, 2021). Com isso, a suplementação pode ter um impacto mais pronunciado em cenários de longo prazo em restrição motora, característico da PC, ou em estágios mais avançados da condição. A ausência de diferenças significativas na proporção das fibras pode refletir um efeito que é mais sutil e requer um período mais extenso para se manifestar.

Sendo assim, como forma de maior compreensão da ATPase, podem ser realizados estudos envolvendo análise do perímetro dos tecidos, para assim serem observados resultados mais consistentes acerca da disposição de fibras musculares na PC. Portanto, mais estudos acerca dessa temática precisam ser realizados para obtenção de resultados significativos sobre as fibras musculares no contexto da PC.

5. CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que a Vit.D pode ter efeitos terapêuticos benéficos na função locomotora e força muscular no modelo experimental de paralisia cerebral apresentado, possivelmente devido à sua ação sobre a função neuromuscular e processos neuroprotetores.

Este estudo contribui para a compreensão de potenciais estratégias terapêuticas envolvendo a Vit.D para o manejo de síndromes neurológicas, como a PC. Mas, para maior compreensão acerca dos efeitos da Vit.D nesse grupo, outros estudos devem ser realizados para maior esclarecimento. Principalmente, no que diz respeito ao entendimento sobre efeitos nas fibras musculares, que não tiveram desfechos significativos na presente pesquisa.

6. FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado por agências públicas, aprovados e vigentes: 4 projetos de auxílio à pesquisa (Projeto CNPQ/Universal 28/2018-processo número 429610/2018-1, Projeto CNPQ/Universal 28/2018- processo número 425743/2018-7, Projeto - PPP – FACEPE-APQ-0201-4.05/14, Projeto FACEPE 08/2014 Programa de Apoio a Núcleos Emergentes APQ-0797.4.05-14).

7. AGRADECIMENTOS

Agradeço ao grupo de estudos em nutrição e plasticidade fenotípica pelo apoio durante a elaboração desse trabalho de pesquisa, bem como a CNPQ e FACEPE pelo apoio financeiro para execução de todo processo para obtenção de recursos para realização e condução da pesquisa.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Benoit B, Meugnier E, Castelli M, Chanon S, Vieille-Marchiset A, Durand C, Bendridi N, Pesenti S, Monternier PA, Durieux AC, Freyssen D, Rieusset J, Lefai E, Vidal H, Ruzzin J. Fibroblast growth factor 19 regulates skeletal muscle mass and ameliorates muscle wasting in mice. **Nat Med**. 2017 Aug;23(8):990-996. doi: 10.1038/nm.4363. Epub 2017 Jun 26. PMID: 28650457.
- [2]. Birge SJ, Haddad JG. 25-Hydroxycholecalciferol stimulation of muscle metabolism. **J Clin Invest** 1975; 56:1100-7
- [3]. Bolland R, de Bolland AR, Ritz E, Hasselbach W. Effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on sarcoplasmic reticulum calcium transport in strontium fed rats. **Calcif Tissue Int** 1983; 35:190
- [4]. Cui, X.; Mcgrath, J.J.; Burne T.H.J; Mackay-Sim, A.; Eyles DW. A depleção materna de vitamina D altera a neurogênese no cérebro de ratos em desenvolvimento. **Int J Dev Neurosci**. 2007; 25 (4):227–232.
- [5]. Cui, X. et al. Vitamin D and the brain: Genomic and non-genomic actions **Molecular and Cellular Endocrinology** Elsevier Ireland Ltd, , 15 set. 2017.
- [6]. Curry OB, Basten JF, Francis MJ, Smith R. Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum

of muscle from vitamin D deficient rabbits. **Nature** 1974; 249:83-4.

[7]. Coq, J. et al. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: Implications for cerebral palsy. **Experimental Neurology**, v. 210, n. 1, p. 95–108, 2008.

[8]. Dahlseng, M. O. et al. Feeding problems, growth and nutritional status in children with cerebral palsy. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, 2012.

[9]. Feron, F.; et al. A deficiência de vitamina D3 no desenvolvimento altera o cérebro de ratos adultos. **Brain Res Bull.** 2005; 65 (2):141–148.

[10]. Giudici, K.V.; Peters, B.S. E.; Martini, L. A. Vitamina D, Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes. **International Life Sciences Institute do Brasil**. V. 2, 2018.

[11]. Hales, C. N. et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **British Medical Journal**, 1991.

[12]. Hales, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis Diabetologia Springer- **Verlag**, jul. 1992.

[13]. Juacy Rodrigues Costa-de-Santana B, Manhães-de-Castro R, José Cavalcanti Bezerra Gouveia H, Roberto Silva E, Antônio da Silva Araújo M, Cabral Lacerda D, Guzmán-Quevedo O, Torner L, Elisa Toscano A. Motor deficits are associated with increased glial cell activation in the hypothalamus and cerebellum of young rats subjected to cerebral palsy. **Brain Res.** 2023 Sep 1; 1814:148447. doi: 10.1016/j.brainres.2023.148447. Epub 2023 Jun 8. PMID: 37301423.

[14]. Krigger, K. W. Cerebral Palsy: An Overview American Family Physician. 2006. Jan 1;73(1):91-100. PMID: 16417071.

[15]. 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**. 2017.

[16]. Lima, et al. Plasticidade Fenotípica, **Rev. Ciência Elem.**, 2017.

[17]. Lichtenstein, A. et al. Vitamina D: ações extraósseas e uso racional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 495–506, 2013.

[18]. Morello, M. et al. Vitamin D Improves Neurogenesis and Cognition in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. **Molecular Neurobiology**, 2018.

[19]. McIntyre, S., Goldsmith, S., Webb, A., et al. Global prevalence of cerebral palsy: A systematic analysis. **Dev Med Child Neurol.** 2022; 00:1–13. <https://doi.org/10.1111/dmcn.15346>.

- [20]. Perng, W.; Oken, E. Programming Long-Term Health: Maternal and Fetal Nutrition and Diet Needs. In: Early Nutrition and Long- **Term Health: Mechanisms, Consequences, and Opportunities**. 2017.
- [21]. Pedrosa, M. A. C.; Castro, M. L. Papel da vitamina D na função neuro-muscular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, p. 495–502, 1 ago. 2005.
- [22]. Pereira SDC, Benoit B, de Aguiar Junior FCA, Chanon S, Vieille-Marchiset A, Pesenti S, Ruzzin J, Vidal H, Toscano AE. Fibroblast growth factor 19 as a countermeasure to muscle and locomotion dysfunctions in experimental cerebral palsy. **J Cachexia Sarcopenia Muscle**. 2021 Dec;12(6):2122-2133. doi: 10.1002/jcsm.12819. Epub 2021 Oct 26. PMID: 34704398; PMCID: PMC8718044.
- [23]. Perenc, L.; Przysada, G.; Trzeciak, J. Cerebral Palsy in Children as a Risk Factor for Malnutrition. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 66, n. 4, p. 224–232, 20 ago. 2015. 32.
- [24]. Pointon JJ, Francis MJ, Smith R. Effect of vitamin D deficiency on sarcoplasmic reticulum function and troponin C concentration of rabbit skeletal muscle. **Clin Sci** 1979; 57:257-63
- [25]. Rosenbaum, P., Paneth, N., Leviton, A., et al. A Report: The Definition and Classification of Cerebral Palsy. **Developmental Medicine & Child Neurology**, 49, 8-14. 2007.
- [26]. Rosenbaum, P. et al. A report: The definition and classification of cerebral palsy April 2006 **Developmental Medicine and Child Neurology** Blackwell Publishing Ltd.
- [27]. Robert Palisano, Peter Rosenbaum, Doreen Bartlett, Michael Livingston. GMFCS - **E & R © CanChild Centre for Childhood Disability Research**, McMaster University. 2007.
- [28]. Rodman JS, Baker T. Changes in the kinetics of muscle contraction in vitamin D depleted rats. **Kidney Int** 1978; 13:189-93.
- [29]. Sellier, E. et al. Decreasing prevalence in cerebral palsy: A multi-site European population-based study, 1980 to 2003. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 58, n. 1, p. 85–92, 1 jan. 2016.
- [30]. Seth A, Aneja S, Singh R, Majumdar R, Sharma N, Gopinath M. Effect of impaired ambulation and anti-epileptic drug intake on vitamin D status of children with cerebral palsy. **Paediatr Int Child Health**. 2017 Aug;37(3):193-198. doi: 10.1080/20469047.2016.1266116. Epub 2017 Feb 1. PMID: 28145154.
- [31]. 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, 1 ago. 2016.
- [32]. 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, 2004a.

[33]. Strata F, Coq JO, Byl N, Merzenich MM. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: implications for a rodent model of cerebral palsy. **Neuroscience**. 2004b;129(1):141-56. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.07.024. PMID: 15489037.

[34]. Taylor, S.N. Vitamina D em bebês, crianças em idade pré-escolar e adolescentes. *Ana. nutr. Metab.* 2020; 76:30–41.

[35]. West-Eberhard, M. J. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny. (A review). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 5, p. 1388–1392, 1986.

[36]. 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, mar. 2008.