



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOTERAPIA

BEATRIZ SOUZA DE SILVEIRA

**EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM RESVERATROL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR DE RATOS SUBMETIDOS À
PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

RECIFE

2023

BEATRIZ SOUZA DE SILVEIRA

**EFEITOS DO TRATAMENTO NEONATAL COM RESVERATROL SOBRE O
DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR DE RATOS SUBMETIDOS À
PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Trabalho apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II, como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Fisioterapia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro

Coorientadora: Ma. Sabrina da Conceição Pereira.

RECIFE

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silveira, Beatriz Souza de.

Efeitos do tratamento neonatal com resveratrol sobre o desenvolvimento neuromotor de ratos submetidos à paralisia cerebral experimental / Beatriz Souza de Silveira. - Recife, 23.

22 : il.

Orientador(a): Ana Elisa Toscano

Coorientador(a): Sabrina da Conceição Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Fisioterapia - Bacharelado, 23.

Inclui referências, apêndices.

1. paralisia cerebral. 2. modelos animais. 3. músculo esquelético. 4. plasticidade fenotípica. 5. resveratrol. I. Toscano, Ana Elisa . (Orientação). II. Pereira, Sabrina da Conceição. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

Efeitos do tratamento neonatal com resveratrol sobre o desenvolvimento neuromotor de ratos submetidos à paralisia cerebral experimental

Beatriz Souza de Silveira^{a,c}, Sabrina da Conceição Pereira^{b,c} e Ana Elisa Toscano^{c,d}

^a *Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil*

^b *Programa de Pós-graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil*

^c *Unidade de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil*

^d *Departamento de Enfermagem, CAV, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão-PE, Brasil*

***Correspondência:**

Autor correspondente

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

E-mail address: aeltoscano@yahoo.com.br (A.E. Toscano).

RESUMO

A Paralisia Cerebral (PC) é um distúrbio não progressivo, resultante da lesão ocorrida no cérebro em desenvolvimento. O estudo tem como objetivo investigar os efeitos do tratamento neonatal com o resveratrol sobre o desenvolvimento neuromotor de ratos submetidos ao modelo de PC. Utilizou-se modelo de PC que associa anóxia a nitrogênio (100%), 9L/min por 12 minutos no (P0 e P1) e restrição sensorio motora durante 16 horas/dia (P2 ao P29) e a manipulação farmacológica administrada (Resveratrol/Salina), por via intraperitoneal do P3 ao P21. E foram analisados: evolução ponderal, desenvolvimento murinométrico, maturação das características somáticas, ontogêneses dos reflexos e atividade locomotora. Os animais submetidos à PC apresentaram menor peso corporal ($p < 0.0001$), no desenvolvimento murinométrico o grupo PCS alcançou menor ELLC ($p < 0.01$), EAPC ($p < 0.03$), CC ($p < 0.0001$) e EL ($p < 0.004$), nas características somáticas a AO foi menor no grupo PC ($p < 0.05$), na ontogênese dos reflexos o grupo PCS apresentou atraso no desaparecimento PP e atraso no aparecimento QL ($p < 0.05$) e na atividade locomotora a redução na distância percorrida, velocidade média, aumento do tempo parado ($p < 0.0001$), e do número de paradas ($p < 0.0021$). O tratamento neonatal com Resveratrol foi capaz de reverter à curto prazo a diminuição no peso corporal, e também a curto e médio prazo reduziu os danos no desenvolvimento murinométrico e locomotor dos animais submetidos à PC.

Palavras-chave: paralisia cerebral; modelos animais; músculo esquelético; plasticidade fenotípica; resveratrol.

ABSTRACT

Cerebral Palsy (CP) is a non-progressive disorder, a consequence of aggression in the developing brain. The study hypothesizes that treatment with resveratrol will act in the recovery of brain injury resulting from CP with influential effects on the acquisition of motor skills and resonance in animals patented for CP. The study aims to investigate the effects of neonatal treatment with resveratrol on the neuromotor development of rats manifested in the model of cerebral palsy. A CP model was used that associates anoxia with intoxication (100%), 9L/min for 12 minutes at (P0 and P1) and sensory motor restriction for 16 hours/day (P2 to P29) and the pharmacological therapy administered (Resveratrol/ Saline), intraperitoneally from P3 to P21. And they were analyzed: ponderal evolution, murinometric development, somatic characteristics, ontogeny of reflexes and locomotor activity. The animals examined by CP had lower body weight ($p < 0.0001$), in the murinometric development the PCS group achieved lower ELLC ($p < 0.01$), EAPC ($p < 0.03$), CC ($p < 0.0001$) and EL ($p < 0.004$), in the somatic features the AO was lower in the PC group ($p < 0.05$), in the ontogenesis of reflexes the PCS group showed a delay in the disappearance of PP and a delay in the appearance of QL ($p < 0.05$) and in the activity locomotor the reduction in the distance covered, average speed, increase in the time stopped ($p < 0.0001$), and the number of stops ($p < 0.0021$). Neonatal treatment with Resveratrol was able to reverse the decrease in body weight in the short term, and also in the short and medium term to avoid damage to the murine and locomotor development of animals left on CP.

Keywords: cerebral palsy; model animals; skeletal muscle; phenotypic plasticity; resveratrol.

1. Introdução

A Paralisia Cerebral (PC) é uma doença neurológica que pode ser entendida como um conjunto de síndromes, sendo caracterizada como um distúrbio do neurodesenvolvimento de cunho não progressivo (Gulati e Sondh, 2017). É considerada a principal desordem motora da infância (Gulati e Sondh, 2017; Stavsky et al., 2017). Compreende um grupo de transtornos do movimento e da postura que ocasiona limitação da capacidade funcional (Bax et al., 2005; Krigger, 2006). Sabe-se que a PC é considerada a principal causa de deficiência física e intelectual na infância (Coq et al., 2016; Reid et al., 2018). Apesar da PC alterar diversos sistemas fisiológicos, sabe-se que o musculoesquelético é o principal sistema afetado na PC (Howard e Herzog, 2021). Dessa maneira, a relação entre o funcionamento motor com o funcionamento neural na PC, acarretará prejuízos na contração muscular e coordenação dos movimentos (Walhain et al., 2021). No modelo de PC observa-se também prejuízos em áreas cerebrais relacionadas ao desenvolvimento e deterioração funcional, especialmente da mobilidade, que é geralmente atribuída à perda de força, equilíbrio e diminuição da capacidade física (Wolan-Nieroda et al., 2022; Peterson, Gordon e Hurvitz, 2013).

A partir da observação dessas consequências funcionais, compreende-se o impacto negativo dos déficits motores da PC na qualidade de vida das crianças acometidas

(Makris, Dorstyn e Crettenden, 2021). Sabe-se que a PC acomete cerca de 3 por 1000 nascidos vivos no mundo (Michael-Asalu et al., 2019). No entanto, esses dados possuem uma maior defasagem em países subdesenvolvidos ou em estado de desenvolvimento, mas sabe-se que o número de casos da PC nesses países é maior, na medida em que existem mais fatores que favorecem o surgimento da PC, devido aos cuidados obstétricos e as condições sanitárias insuficientes (Himmelmann et al., 2013). No que diz respeito ao surgimento de casos no Brasil, estima-se que ocorram 30.000 a 40.000 novos casos por ano (Mancini et al., 2002). Configurando-se assim, como uma questão de saúde pública que merece atenção.

Em relação a etiologia da PC, sabe-se que existem alguns fatores de risco para o seu surgimento, principalmente insultos nos períodos pré-natais e perinatais (Oskoui et al., 2013). Ocupando um lugar de destaque, o parto prematuro, a hipoglicemia neonatal, a hipóxia-isquemia e a asfixia durante o parto (Sewell, Eastwood e Wimalasundera, 2014; Oskoui et al., 2013). Devido ao aumento de casos de PC e as repercussões funcionais, ela tem sido objeto de diversas pesquisas. No entanto, os estudos sobre a locomoção apresentam um lugar de destaque na literatura ainda, mesmo com outros sistemas sendo afetados.

Diversos modelos de PC tentam reproduzir esses danos locomotores, e consequentemente buscam reproduzir as repercussões neurofuncionais no desenvolvimento motor (Da Conceição Pereira et al., 2021). Assim, modelos experimentais tornaram-se ferramentas fundamentais na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da PC e nos estudos que utilizam propostas terapêuticas para os prejuízos da PC à curto e à longo prazo (Da Conceição Pereira et al., 2021). Dentre os modelos de PC, destaca-se o que se associa a anóxia à restrição sensorial motora por sua efetividade em reproduzir o fenótipo motor da PC semelhante aos humanos (Da Conceição Pereira et al., 2021). Estudos demonstram que este modelo de combinação de insultos leva a danos no sistema nervoso central como a lesão de substância branca periventricular e decréscimo da densidade neuronal. Desse modo, resultantes do evento isquêmico no cérebro imaturo e consequente estresse oxidativo que desencadeiam prejuízos no controle motor por centros superiores e alterações musculares como a atrofia por desuso (Stigger et al., 2011). Sendo assim, evidenciados nos animais a redução na atividade locomotora, prejuízos na função motora oral, na coordenação motora, fraqueza muscular, além de habilidades motoras prejudicadas (Coq et al., 2016; Lacerda et al., 2017b; Marcuzzo et al., 2010; Silva et al., 2016; Strata et al., 2004).

Apesar das conhecidas repercussões clínicas da PC, atualmente o tratamento desses pacientes é de manejo às sequelas, e existe uma escassez de intervenções que seja capaz de reverter ou atenuar os danos no cérebro imaturo e que beneficie consequentemente o desenvolvimento neuromotor. Intervenções sobre o sistema nervoso central foram sugeridas como as terapias destinadas a reduzir o estresse oxidativo, interrompendo a cascata lesional (Juil e Ferriero, 2014), destacando-se o uso dos polifenóis, que são compostos naturais existentes em plantas e em alguns alimentos que apresentam efeitos promissores em lesões cerebrais importantes para a proteção e prevenção de doenças crônicas (Adefegha, 2018; Rebas et al., 2020).

Dentre os polifenóis, destaca-se o resveratrol, um composto presente em alguns alimentos e bebidas, como o vinho tinto (Park et al., 2012) que apresenta forte ações antioxidantes, anti-inflamatórias e neuroprotetoras no cérebro (Bastianetto, Ménard e Quirion, 2015). E tem sido demonstrado como uma intervenção promissora em modelos de neurodegeneração (doença de Alzheimer, Parkinson ou Huntington) e em modelos de hipóxia-isquemia como estratégia neuroprotetora (Arteaga et al., 2014; Juul, Ferriero, 2014; Pan et al., 2016). Os efeitos neuroprotetores do resveratrol resultam de sua atividade antioxidante (Arteaga et al., 2014) e pode reduzir a intensidade do processo inflamatório e apoptose celular, através da inibição de citocinas pro inflamatórias TNF α e IL-6 (Palacz-Wrobel et al., 2017; Pan et al., 2016). Dessa maneira, o resveratrol pode reduzir significativamente a lesão cerebral, preservando áreas cerebrais como o córtex sensorio-motor, e reduzir o dano à substância branca (Arteaga et al., 2014), além de que foi demonstrado ser capaz de reduzir a perda de tecido cerebral após lesão hipóxica-isquêmica em ratos neonatais (Pan et al., 2016).

Assim, o presente estudo tem como objetivo geral investigar os efeitos do tratamento neonatal com o resveratrol sobre o desenvolvimento neuromotor de ratos submetidos a um modelo de paralisia cerebral.

2. Materiais e métodos

2.1 Animais e condições de biotério

Trata-se de um estudo experimental com animais, nos quais os procedimentos foram efetuados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e das normas internacionais do *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (8ª ed). Utilizou-se filhotes ratos machos *Rattus Norvegicus Albinus* da linhagem Wistar, nascidos no biotério de criação do Departamento de Nutrição da UFPE, resguardados com temperatura de 22 ± 2 °C, ciclo claro-escuro invertido de 12/12 horas (Ciclo claro - 20:00 às 8:00h; Ciclo escuro - 08:00 às 20:00 h), abrigados em gaiolas de polipropileno (46cmx34cmx20cm) forrada com maravalha estéril, com acesso livre à água e alimentação (dieta Labina – Purina S/A). O estudo foi realizado na UENPF, localizado no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. O projeto encontra-se aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA: 0009/2020), (Material suplementar).

2.2 Modelo experimental de paralisia cerebral

Foi empregado no estudo o modelo experimental de PC que associa a anóxia perinatal juntamente com a restrição sensorio-motora dos membros posteriores dos animais com base nos experimentos de Strata et al. (2004), Coq et al. (2008) e Marcuzzo et al. (2010). Os filhotes foram submetidos a dois episódios de anóxia no dia do nascimento e primeiro dia pós-natal (P0 e P1), onde foram expostos a nitrogênio (100%) a 9L/min por 12 minutos cada. Em seguida, colocados em ar e temperatura ambiente para recuperação e após estabilização foram devolvidos as suas respectivas mães. A restrição sensorio-motora foi realizada do P2 ao P28 durante 16 horas por dia em que uma órtese de epóxi foi fixada nos membros posteriores dos animais de forma a limitar os

movimentos da articulação do quadril, sem atrapalhar a eliminação de fezes e urina e permitir 8 horas de livre movimentação (Strata et al., 2004).

2.3 Manipulação farmacológica

A aplicação ocorreu no período neonatal, do 3º ao 21º dia de vida pós-natal, por via intraperitoneal, com administração do resveratrol (dose diária, 10mg/kg) ou salina (0,9% NaCl), com volume de injeção de 0,1 ml / 100 g peso do rato conforme pesagem diária (Girbovan e Plamondon et al., 2015).

2.4 Grupos experimentais

Para obtenção dos filhotes foram utilizadas ratas fêmeas nulíparas e machos reprodutores, da espécie *Rattus Norvegicus Albinus* da linhagem Wistar, que foram acasalados e mantidos no biotério do Departamento de Nutrição da UFPE. Após o nascimento, os filhotes machos foram distribuídos nos grupos experimentais de forma aleatória, sendo incluídos filhotes machos saudáveis com um peso corporal ideal (6 a 8 gramas). As filhotes fêmeas foram utilizadas apenas para completar a ninhada de 8 filhotes até o dia do desmame e foram parte de outros experimentos do grupo de pesquisa. E sendo excluídos animais deficientes, pais irmãos e mães com mais 120 dias de nascimento. Dessa maneira, foram formados os quatro grupos experimentais: Controle Salina (CS, filhotes que receberam a solução 0,9% NaCl); Paralisia Cerebral + Salina (PCS, filhotes que foram submetidos à PC experimental + solução 0,9% NaCl); Controle + Resveratrol (CR, filhotes que receberam 10mg/kg de resveratrol em solução 0,9% NaCl); Paralisia Cerebral + Resveratrol (PCR, filhotes que foram submetidos à PC experimental + 10mg/kg de resveratrol em solução 0,9% NaCl). No 25º dia de vida pós-natal foi realizado o desmame em que os filhotes machos foram colocados em gaiolas individuais até a eutanásia no 29º dia pós-natal (Girbovan e Plamondon et al., 2015).

2.5 Coleta de dados

2.5.1 Evolução ponderal

Para monitorar o crescimento dos animais, o peso corporal dos filhotes foi verificado a partir do nascimento dos animais até o 21º dia de vida pós-natal (P21) que representa o último dia de administração farmacológica e no 29º dia de vida pós-natal (P29). A pesagem dos animais foi obtida através de uma balança digital eletrônica (Marte, S-1000 modelo, a capacidade de 1 kg e 0,1 g de sensibilidade).

2.5.2 Desenvolvimento murinométrico

Os filhotes foram avaliados nas idades de 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 pós-natal. Cada animal foi avaliado com auxílio de um paquímetro digital (JOMARCA®) quanto às medidas de: Comprimento da cauda (CC); Eixo látero-lateral do crânio (ELLC); Eixo ântero-posterior do crânio (EAPC); e Eixo longitudinal (EL); (Silva et al., 2005), (Apêndice A e C).

2.5.3 Maturação das características somáticas

A partir do 1º dia de vida pós-natal até a maturação completa da característica física, sendo anotado o tempo em dias até o seu aparecimento. Foram avaliados: Abertura do pavilhão auditivo (APA) Abertura do conduto auditivo (ACA); Erupção dos incisivos inferiores (EII); Erupção dos incisivos superiores (EIS); e Abertura dos olhos (AO); (Smart e Dobbin, 1971), (Apêndice A e C).

2.5.4 Ontogênese dos reflexos

Do 1º ao 21º dia pós-natal, foi avaliado o aparecimento e desaparecimento de reflexos relacionados à maturação motora. Para cada reflexo, o dia da consolidação foi considerado o primeiro dia da sequência de três dias consecutivos de aparecimento completo da resposta reflexa esperada. foram investigados os reflexos: Prensão palmar (PP); Recuperação de decúbito (RD); Colocação pelas vibrissas (CV); Aversão ao precipício (AP); Resposta ao susto (RS); Geotaxia negativa (GN); Queda livre (QL); (Falcão-Tebas et al., 2012; Fox, 1965), (Apêndice B e C).

2.5.5 Desenvolvimento da atividade locomotora

A atividade locomotora foi avaliada nas idades de 8, 14, 17 e 21 dias pós-natal através da análise em campo aberto. A qual utilizou o software Anymaze (San Diego Instruments) em que os animais foram colocados no centro do campo aberto e gravados em vídeo durante um período de 5 minutos cada. O teste ocorreu em sala escura anexa ao biotério de manutenção, durante o ciclo escuro. Os parâmetros obtidos foram: Distância percorrida (m); Velocidade média (m/s); Tempo que o animal permaneceu parado(s); Número total de paradas feitas pelo animal; Proporção entre o tempo parado/número de paradas(s); Tempo de permanência nas áreas central, intermediária e periférica do campo aberto.

3. Análise Estatística

Os dados obtidos foram avaliados quanto à normalidade da distribuição, por meio do teste de Shapiro-Wilk. Se for comprovada a distribuição normal, serão executados os testes paramétricos apropriado como o Anova 2-Way para comparação dos grupos nas análises realizadas em apenas uma idade do animal, ou o Anova 2-Way parâmetros repetidos para comparação dos grupos nas análises realizadas em mais de uma idade. Se não houver distribuição normal, serão empregados testes estatísticos não paramétricos: teste de Kruskal-Wallis e Friedman. Os resultados foram definidos como média \pm erro padrão ou como mediana e valores máximos e mínimos, sendo o nível de significância utilizado de 5%. Foi aplicado o *software* GraphPadPrism® versão 6 para obter as análises dos dados e auxiliar na construção dos gráficos.

4. Resultados

Os procedimentos experimentais foram coletados e houve processamento de dados. Dessa maneira, será apresentado os resultados dos filhotes que foram avaliados diariamente durante o período de lactação até o 29º dia de vida a fim de compreender os efeitos a curto e médio prazo do tratamento neonatal com resveratrol sobre o desenvolvimento neuromotor.

3.1 Evolução ponderal

O modelo experimental de paralisia cerebral provocou a redução do peso corporal dos animais aos 8 ($p=0.0142$), 14 ($p<0.0001$), 17 ($p<0.0001$), 21 ($p<0.0001$) e 29 ($p<0.0001$) dias de vida pós-natal quando comparado ao grupo controle. Em que o tratamento neonatal com resveratrol na PC experimental atenuou essa perda de peso no 21º dia de vida ($p=0.0209$) (Figura 1).

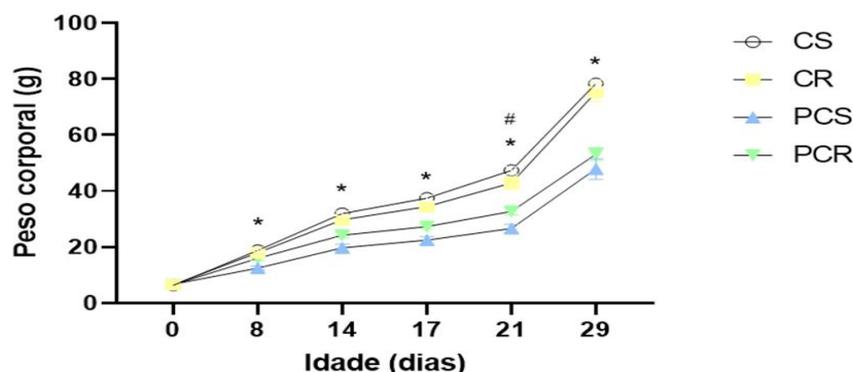


Figura 1: Evolução ponderal dos grupos experimentais aos 0, 8, 14, 17, 21 e 29 dias de vida pós-natal: Controle Salina (CS, $n=14$), Controle Resveratrol (CR, $n=11$), Paralisia Cerebral + Salina (PCS, $n=11$) e Paralisia Cerebral + Resveratrol (PCR, $n=12$). Os dados foram expressos como média \pm DP. ANOVA Two Way e teste post hoc de Tukey: CS x CR^a; PCS x CS^{*}; PCS x PCR[#].

3.2 Desenvolvimento murinométrico

O desenvolvimento murinométrico também foi afetado pela PC experimental, onde o grupo PCS apresentou menores medidas corporais comparado ao grupo CS. Sendo assim, nas medidas dos eixos do crânio foi observado no PCS menor Eixo látero-lateral aos 12 ($p<0.0001$), 15 ($p<0.0384$), 21 ($p<0.0006$) e 29 ($p<0.0001$) dias de vida pós natal, e menor Eixo ântero-posterior aos 3 ($p=0.0124$), 12 ($p=0.0017$), 15 ($p=0.0134$), 18 ($p=0.0020$) 21 ($p<0.0001$) e 29 ($p=0.0004$) dias de vida. De forma semelhante, o comprimento da cauda também foi comprometido a partir do 9º dia de vida pós natal (9 dias $p=0.0339$, 12 dias $p=0.0255$, 15 dias $p=0.0118$, 18 dias $p=0.0065$, 21 dias $p<0.0001$, e 29 dias $p<0.0001$), assim como o Eixo longitudinal à partir do 12º dia de vida (12 dias $p=0.0257$, 15 dias $p<0.0001$, 18 dias $p<0.0001$, 21 dias $p<0.0001$, e 29 dias $p=0.0082$) (Figura 2, A e B).

O tratamento com resveratrol nos animais com PC atenuou os prejuízos no desenvolvimento corporal. Quanto ao comprimento da cauda aos 29 dias de vida ($p=0.0013$) e ao eixo longitudinal aos 6 ($p=0.0090$), 9 ($p=0.0028$) e 12 ($p=0.0077$) dias de vida pós-natal. Adicionalmente, nos animais controles submetidos ao tratamento com

resveratrol também foi possível observar um aumento na medida de eixo longitudinal do corpo aos 6 (p=0.0043) e 9 (p=0.0079) dias de vida (Figura 2, C e D).

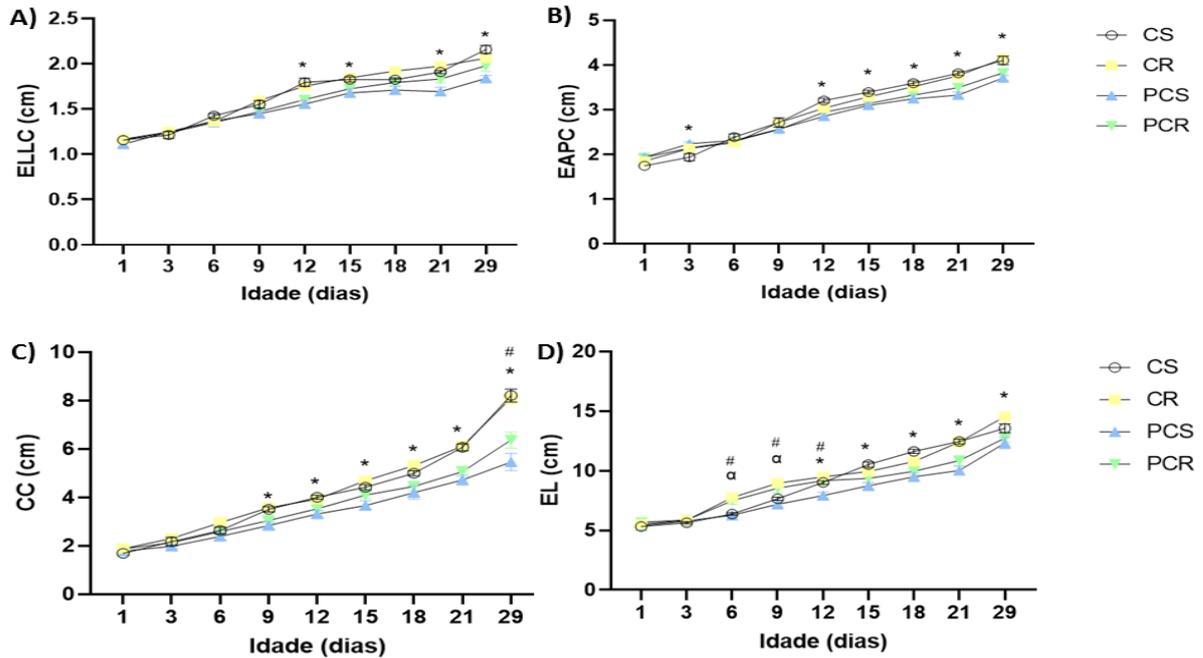


Figura 2: Desenvolvimento murinométrico dos grupos experimentais aos 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 29 dias pós natal: Controle Salina (CS, n=12), Controle Resveratrol (CR, n=10), Paralisia Cerebral + Salina (PCS, n=11) e Paralisia Cerebral + Resveratrol (PCR, n=12). A) Eixo látero-lateral do crânio (ELLC), B) Eixo ântero-posterior do crânio (EAPC), C) comprimento da cauda (CC) e D) Eixo longitudinal (EL). Os dados foram expressos como média \pm DP. ANOVA Two Way e teste post hoc de Tukey: CS x CR^α; PCS x CS^{*}; PCS x PCR[#].

3.3 Maturação das características somáticas

Diversas características somáticas apresentaram alterações devido à PC experimental, demonstrando que houve o atraso na abertura do pavilhão auditivo (p=0.0124), na abertura do conduto auditivo (p=0.0003) e na abertura dos olhos (p<0.0001) comparado ao grupo controle. O tratamento com resveratrol na PC experimental não influenciou a maturação das características somáticas (Figura 3).

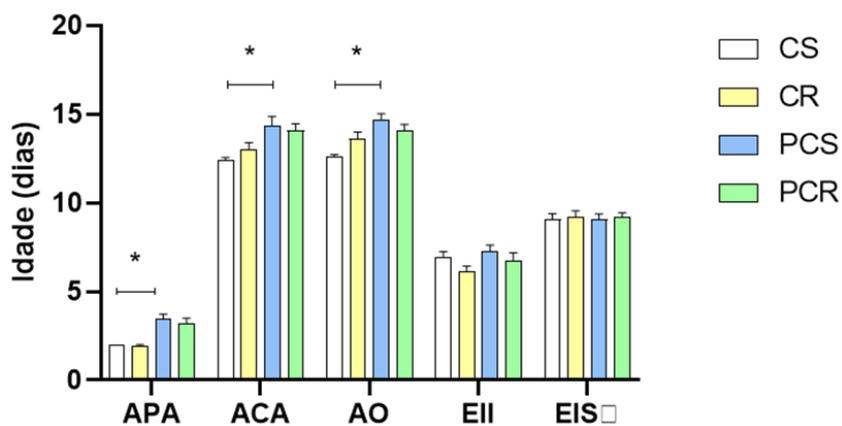


Figura 3: Maturação das características somáticas dos grupos experimentais entre o 1º e 21º dia pós natal: Controle Salina (CS, n=12), Controle Resveratrol (CR, n=10), Paralisia Cerebral + Salina (PCS, n=12) e Paralisia Cerebral + Resveratrol (PCR, n=12). Abertura do pavilhão auditivo (APA), abertura do conduto auditivo (ACA), abertura dos olhos (AO), erupção dos incisivos inferiores (EII) e erupção dos incisivos superiores (EIS). Os dados foram expressos como média \pm DP. ANOVA Two Way e teste post hoc de Tukey: CS x CR^a; PCS x CS*^{*}; PCS x PCR[#].

3.4 Ontogênese de reflexos

Os reflexos do desenvolvimento também foram alterados pela PC experimental, em que houve o atraso no desaparecimento do reflexo de preensão palmar ($p=0.0003$) e atraso no aparecimento dos reflexos de geotaxia negativa ($p=0.0463$) e queda livre ($p<0.0001$) comparado ao grupo controle. O tratamento com resveratrol foi capaz de atenuar esse retardo no aparecimento dos reflexos de geotaxia negativa ($p=0.0463$) e queda livre ($p=0.0374$) (Figura 4).

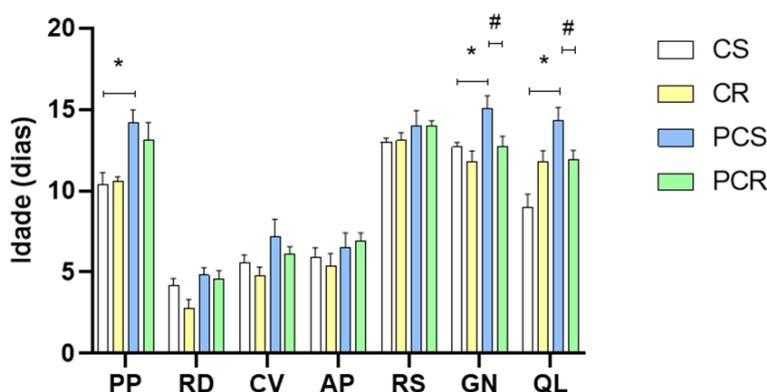


Figura 4: Ontogênese de reflexos dos grupos experimentais entre o 1º e 21º dia pós natal: Controle Salina (CS, n=12), Controle Resveratrol (CR, n=10), Paralisia Cerebral + Salina (PCS, n=11) e Paralisia Cerebral + Resveratrol (PCR, n=12). Reflexo de preensão palmar (PP), reflexo de recuperação de decúbito-(RD), reflexo de colocação pelas vibrissas (CV), reflexo de aversão ao precipício (AP), reflexo de resposta ao susto (RS), reflexo de queda livre (QL) e reflexo de geotaxia negativa (GN). Os dados foram expressos como média \pm DP. ANOVA Two Way e teste post hoc de Tukey: CS x CR^a; PCS x CS*^{*}; PCS x PCR[#].

3.5 Desenvolvimento da atividade locomotora

A PC experimental provocou alterações nos diversos parâmetros locomotores dos animais, como a redução na distância percorrida ($p<0.0001$) e velocidade média ($p<0.0001$) aos 28 dias de vida, e o aumento do tempo parado ($p<0.0001$) e do número de paradas ($p<0.0021$) aos 28 dias de vida. Além disso, a capacidade exploratória dos animais também foi afetada pelo modelo de PC, onde os animais do grupo PCS apresentaram maior tempo gasto na área 2 (intermediária do campo aberto) aos 17 dias de vida ($p=0.0084$), e menor tempo gasto na área 3 (região periférica do campo) aos 14 ($p=0.0004$) e 17 ($p=0.0007$) dias de vida pós-natal (Figura 5).

O tratamento com Resveratrol foi capaz de reduzir os danos a locomoção, onde o grupo PCR apresentou aumento da distância percorrida aos 21 ($p=0.0004$) e 28 ($p=0.0015$) dias, e aumento da velocidade média aos 28 ($p=0.0030$) dias comparado ao PCS. De forma semelhante, o resveratrol levou ao aumento do tempo gasto na área 3 do

campo aberto aos 14 ($p=0.0045$) e 17 ($p=0.0237$) dias de vida no grupo PCR comparado ao PCS. A exposição ao resveratrol neonatal nos animais controle também estimulou a locomoção, em que o grupo CR apresentou maior distância percorrida aos 14 ($p=0.026$) e 21 ($p=0.035$) dias e aumento da velocidade média também aos 14 ($p=0.046$) e 21 ($p=0.037$) dias de vida pós-natal (Figura 5).

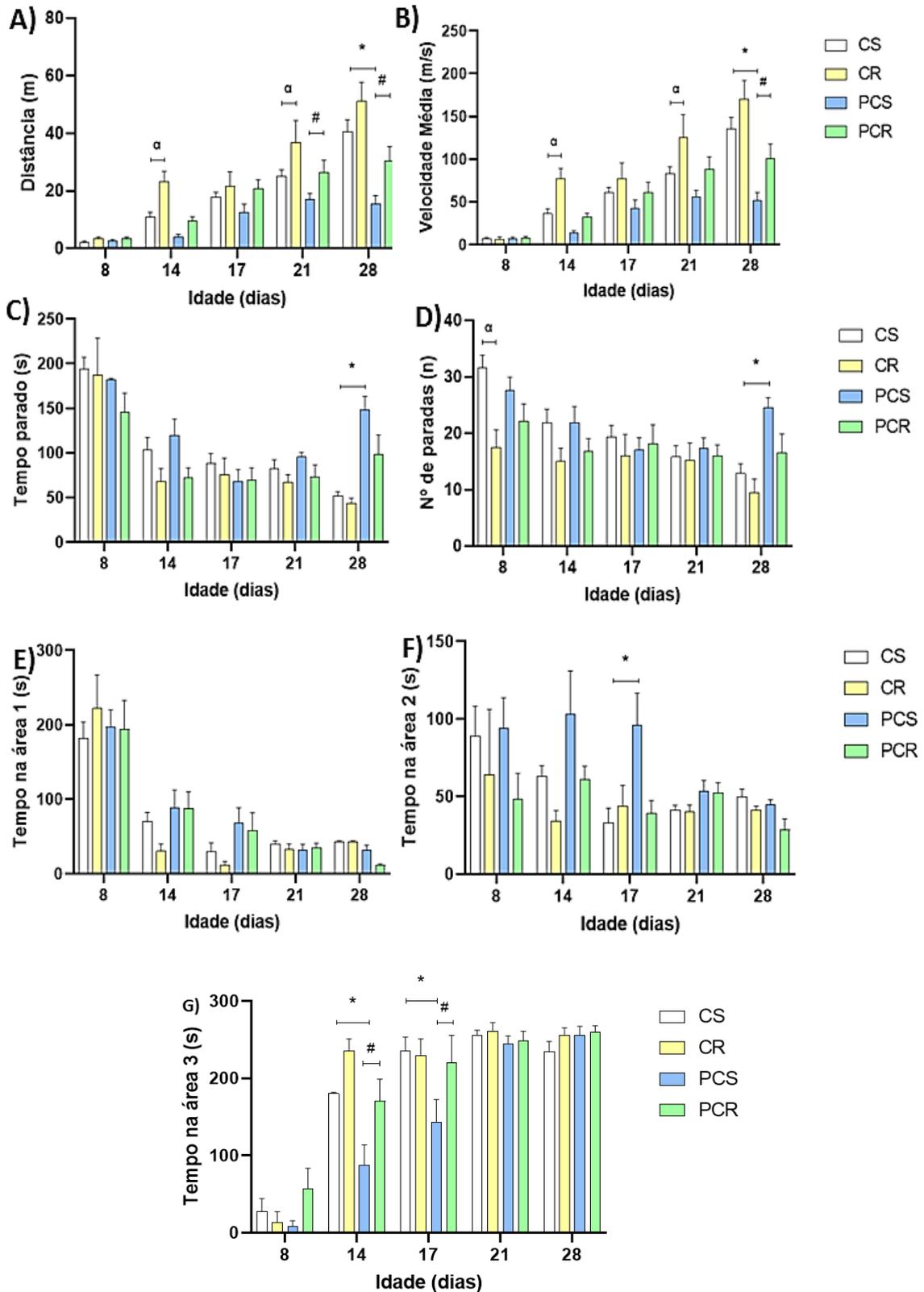


Figura 5: Atividade locomotora em campo aberto dos grupos experimentais aos 8, 14, 17, 21 e 28 dias de vida pós natal: Controle Salina (CS, n=12), Controle Resveratrol (CR, n=10), Paralisia Cerebral + Salina (PCS, n=11) e Paralisia Cerebral + Resveratrol (PCR, n=10). A) Distância percorrida (m); B) Velocidade média (m/s); C) Tempo que o animal permaneceu parado (s); D) Número total de paradas feitas pelo animal (n); E) Tempo de permanência na área 1 - central (s), F) Tempo de permanência na área 2 - intermediária (s) e G) Tempo de permanência na área 3 - periférica (s) do campo aberto. Os dados foram expressos como média \pm DP. ANOVA Two Way e teste post hoc de Tukey: CS x CR^a; PCS x CS^{*}; PCS x PCR[#].

5. Discussão

No presente estudo foi possível observar o fenótipo motor da PC, visto pela redução da evolução ponderal, diminuição das medidas no desenvolvimento murinométrico, atraso na maturação das características somáticas, atraso no aparecimento e no desaparecimento dos reflexos e alterações nos diversos parâmetros locomotores. E a partir desses desfechos, o tratamento neonatal com resveratrol foi capaz de melhorar o peso corporal e as medidas murinométricas, minimizar o retardo no aparecimento dos reflexos como também reduzir os danos na locomoção.

Os resultados indicam que os insultos sofridos no período perinatal, podem interferir no desenvolvimento somático, sendo encontrada diferenças significativas entre os grupos a partir do 8º dia de vida em que os animais submetidos à PC experimental apresentaram menor evolução ponderal comparado aos animais controle. Assim como verificaram (Coq et al., 2016; Strata et al., 2004), que utilizaram a anóxia perinatal associada à restrição sensório-motora, em que os animais apresentaram efeitos duradouros como o atraso no desenvolvimento ponderal (Silva et al., 2016; Strata et al., 2004). A exposição à estressores, como acontece no presente estudo onde foi realizado a restrição sensório-motora diariamente, tende a reduzir a ingestão alimentar, pela redução das fibras musculares do masseter, sendo esse um dos principais músculos envolvidos na mastigação (Lacerda et al., 2017).

Além disso, o estudo de Pereira e colaboradores (2021), o qual utilizaram o mesmo modelo de PC, observaram a redução das fibras musculares dos músculos sóleo e EDL como também a diminuição da massa óssea da tíbia (Pereira et al., 2021), propiciando prejuízos na locomoção. Dessa maneira, compreende-se que os danos no sistema musculoesquelético são capazes de afetar o comportamento alimentar dos animais, o que justificaria o resultado desse estudo. O tratamento com resveratrol conseguiu atenuar a perda de peso a partir do 21º dia de vida, nos animais PCR quando comparados com o grupo PCS. Porém, atualmente, desconhecemos outros estudos que avaliem os efeitos do resveratrol nestes desfechos em modelos de paralisia cerebral.

Através do desenvolvimento murinométrico foi notório observar também que o modelo de paralisia cerebral empregado alterou o desenvolvimento corporal dos animais, apresentando diminuição das medidas dos eixos do crânio, do comprimento da cauda e do eixo longitudinal no grupo PCS comparado ao grupo CS. Corroborando com os estudos de Strata e colaboradores (2004) e de Coq e colaboradores (2016) que relatam a redução na taxa de crescimento corporal. Por meio do tratamento com o resveratrol nos

grupos submetidos à PC, foi observado o aumento no comprimento da cauda aos 29 dia de vida e no eixo longitudinal aos 6º dia de vida pós-natal. Como também no grupo CR notou-se o aumento na medida do eixo longitudinal aos 6º dia de vida pós-natal. Demonstrando dessa maneira, os efeitos neuroprotetores do resveratrol resultantes de sua atividade antioxidante que pode estar relacionado à manutenção da integridade e do potencial da membrana interna mitocondrial e à redução de espécies reativas de oxigênio reduzindo desse modo, a intensidade do processo inflamatório causado através desse modelo (Arteaga et al., 2015).

Observa-se que houve prejuízos na maturação das características somáticas significativamente de animais que foram submetidos pelo insulto da PC, sendo possível notar atrasos no aparecimento da abertura do pavilhão auditivo, do conduto auditivo e dos olhos com relação aos animais do grupo controle. É visto nos estudos que há essa correlação entre animais submetidos à PC leva danos ao SNC com a lesão de substância branca periventricular e decréscimo da densidade neuronal, resultantes do evento isquêmico no cérebro imaturo (Silva et al., 2016; Strata et al., 2004). E através dessas lesões, sejam durante a gestação ou após o nascimento, podem acarretar em prejuízos no desenvolvimento dos animais (Toso et al., 2005). No entanto, o tratamento neonatal com resveratrol, não conseguiu interromper o atraso das características somáticas de forma significativa, no presente estudo.

Em relação a ontogênese dos reflexos, observa-se alterações nos animais dos grupos submetidos à PC, em que houve atraso no desaparecimento do reflexo de preensão palmar e atraso no aparecimento dos reflexos de geotaxia negativa e queda livre, quando comparados ao grupo controle. Desse modo, constata-se na literatura que animais que foram submetidos ao modelo de PC têm um perfil de diminuição do funcionamento neural (Strata et al., 2004), que ocasionará em um déficit na comunicação com o sistema musculoesquelético e a medula espinhal, seguido de déficit proprioceptivo, déficit na capacidade motora voluntária e déficit na percepção de estímulos dolorosos (nocicepção) como é visto em cães (Demey et al., 2006). A exposição ao tratamento com o uso do resveratrol minimizou os retardo no aparecimento dos reflexos de geotaxia negativa e queda livre devido a capacidade do resveratrol de reduzir a perda de tecido cerebral após lesão hipóxica-isquêmica em ratos neonatais (Pan et al., 2016), pela sua ação antioxidante dispõem da propriedade de eliminar uma variedade de radicais livres (Wang et al., 2014).

Na atividade locomotora, verificou-se que os grupos que foram submetidos a PC experimental demonstraram uma redução na distância percorrida, velocidade média, aumento do tempo parado, do número de paradas e da capacidade exploratória na área 2 e 3 dos animais comparados com o grupo controle. Esses achados são semelhantes aos encontrados no estudo de Pereira e colaboradores (2021), em que os animais apresentaram redução na atividade de locomoção, coordenação motora e força muscular acarretando danos ao sistema musculoesquelético. Em outro estudo, em que se utilizava o mesmo modelo de PC, os animais do grupo PC desenvolveram características similares ao pé equino, provavelmente por terem sido submetidos a extensão do joelho e tornozelo durante a restrição sensório-motora (Delcour et al., 2018), desta forma, proporcionando

a marcha anormal observada nos animais do presente estudo. O tratamento neonatal com resveratrol no grupo PCR apresentou aumento da distância percorrida a partir do 21º dia de vida, aumento da velocidade média ao 28º dia de vida pós-natal comparado ao PCS. Com também, proporcionou o aumento do tempo gasto na área 3 a partir do 14º ao 17º dias de vida no grupo PCR comparado ao PCS. Além do tratamento com o resveratrol proporcionar ao grupo CR um aumento da distância percorrida do 14º ao 21º dias de vida e também possibilitar um aumento da velocidade média do 14º ao 21º dias de vida pós-natal. Configurando desse modo, os efeitos neuroprotetores do resveratrol, por ser inibidor de reações pro-oxidantes (Pallas et al., 2013), atenuar a atrofia muscular e melhorar a saúde muscular (Nikawa et al., 2021), sinalizando que este polifenol pode agir sobre o sistema musculoesquelético.

Nesse contexto, sugerimos que estudos futuros sejam realizados para elucidar os mecanismos moleculares e bioquímicos onde o resveratrol afeta benéficamente o sistema nervoso do animal saudável.

Em síntese, o presente estudo demonstrou que o resveratrol pode trazer benefícios a curto e médio prazo aos prejuízos causados no sistema neuromusculoesquelético. Sendo dessa maneira, uma das limitações do estudo não ser possível avaliar a longo prazo os efeitos do resveratrol. Nesse contexto, sugere-se uma nova perspectiva para realização de pesquisas futuras sobre o uso do resveratrol a longo prazo no tratamento da paralisia cerebral, como também o uso do resveratrol para beneficiar outros modelos de atrofia muscular como a desnutrição. Assim, como são fundamentais mais estudos para estabelecer os mecanismos de ação envolvidos e para estabelecer a melhor forma de administração afim de se obter um efeito benéfico e prolongado.

5. Conclusão

Concluimos que o presente estudo, demonstra que o modelo de PC leva a danos ao desenvolvimento somático, murinométrico e locomotor dos animais. Sendo assim, nossos resultados corroboram o que já está estabelecido na literatura, em que o modelo de PC que associa anóxia com restrição sensorio motora é capaz de promover alterações, semelhante ao fenótipo neuromotor da PC em crianças. Além disso, a PC experimental promoveu retardo no aparecimento dos reflexos de preensão palmar e queda livre, consistente com a lesão cerebral induzida no período crítico de desenvolvimento.

De forma original, esses resultados conseguiram evidenciar que o tratamento neonatal com Resveratrol foi capaz de reverter à curto prazo a diminuição no peso corporal, e também a curto e médio prazo reduziu os danos no desenvolvimento murinométrico, como também diminuiu os danos da locomoção. Isso demonstra os efeitos promissores do resveratrol no desenvolvimento somático e locomotor na PC, que pode estar relacionado aos seus efeitos antioxidantes e neuroprotetores. Propõe-se que o tratamento com resveratrol reverta os danos no comportamento do sistema neuromusculoesquelético em ratos submetidos à PC.

Referências

Adefegha, A.S., 2018. Functional Foods and Nutraceuticals as Dietary Intervention in

Chronic Diseases; Novel Perspectives for Health Promotion and Disease Prevention. *J Diet Suppl.* 2;15 (6), 977-1009. <https://doi.org/10.1080/19390211.2017.1401573>.

Anderson, V., Spencer-Smith, M., Wood, A., 2011. Do children really recover better? Neurobehavioural plasticity after early brain insult. *Brain.* 134 (8), 2197-221. <https://doi.org/10.1093/brain/awr103>.

Arteaga, O., et al., 2015. Pretreatment with Resveratrol Prevents Neuronal Injury and Cognitive Deficits Induced by Perinatal Hypoxia-Ischemia in Rats. *PLoS One.* 6;10 (11), e0142424. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142424>.

Bastianetto, S., Ménard, C., Quirion, R., 2015. Neuroprotective action of resveratrol. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease,* 1852 (6), 1195-1201. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.09.011>.

Bax, M., et al., 2005. Executive Committee for the Definition of Cerebral Palsy. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Dev Med Child Neurol.* 47 (8), 571-6. <https://doi.org/10.1017/s001216220500112x>.

Coq, J.O., et al. 2008. Impact of neonatal asphyxia and hind limb immobilization on musculoskeletal tissues and S1 map organization: implications for cerebral palsy. *Exp Neurol.* 210 (1), 95-108. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.006>.

Coq, J.O., et al., 2016. Prenatal ischemia deteriorates white matter, brain organization, and function: implications for prematurity and cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol.* 4 (4), 7-11. <https://doi.org/10.1111/dmcn.13040>.

Da Conceição Pereira S., et al., 2021. Locomotion is impacted differently according to the perinatal brain injury model: Meta-analysis of preclinical studies with implications for cerebral palsy. *J Neurosci Methods.* 360, 109250. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2021.109250>.

Delcour, M., et al., 2018. Early movement restriction leads to enduring disorders in muscle and locomotion. *Brain Pathol.* 28 (6), 889-901. <https://doi.org/10.1111/bpa.12594>.

Fragopoulou, A.F., et al., 2019. Can Neonatal Systemic Inflammation and Hypoxia Yield a Cerebral Palsy-Like Phenotype in Periadolescent Mice? *Mol Neurobiol.* 56 (10), 6883-6900. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1548-8>.

Girbovan, C., Plamondon, H., 2015. Resveratrol downregulates type-1 glutamate transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats. *Brain Research,* 1608, 203-214. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.02.038>.

Gulati, S., Sondhi, V., 2018. Cerebral Palsy: An Overview. *Indian J Pediatr.* 85 (11), 1006-1016. <https://doi.org/10.1007/s12098-017-2475-1>.

- Himmelmann, K., 2013. Epidemiology of cerebral palsy. *Handb Clin Neurol.* 111, 163-7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52891-9.00015-4>.
- Howard, J.J., Herzog, W., 2021. Skeletal Muscle in Cerebral Palsy: From Belly to Myofibril. *Front Neurol.* 12, 620852. <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.620852>.
- Johnston, M.V., et al., 2009. Plasticity and injury in the developing brain. *Brain Dev.* 31 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2008.03.014>.
- Johnston, M.V., Hoon, A.H. Jr., 2006. Cerebral palsy. *Neuromolecular Med.* 8 (4), 435-50. <https://doi.org/10.1385/NMM:8:4:435>.
- Jones, M.W., et al., 2007. Cerebral palsy: introduction and diagnosis (part I). *J Pediatr Health Care.* 21 (3), 146-52. <https://doi.org/10.1016/j.pedhc.2006.06.007>.
- Juul, S.E., Ferriero, D.M., 2014. Pharmacologic neuroprotective strategies in neonatal brain injury. *Clin Perinatol.* 41 (1), 119-31. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2013.09.004>.
- Kesar, T.M., et al., 2012. Motor cortical functional geometry in cerebral palsy and its relationship to disability. *Clin Neurophysiol.* 123 (7), 1383-90. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2011.11.005>.
- Krigger, K.W., 2006. Cerebral palsy: an overview. *Am Fam Physician.* 73 (1), 91-100. PMID: 16417071.
- Lacerda, D.C., et al., 2017. Oro-facial functions in experimental models of cerebral palsy: a systematic review. *J Oral Rehabil.* 44 (4), 251-260. <https://doi.org/10.1111/joor.12489>.
- Lacerda, D.C., et al., 2017b. Perinatal undernutrition associated to experimental model of cerebral palsy increases adverse effects on chewing in young rats. *Physiol Behav.* 173, 69-78. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.043>.
- Mancini, M.C., et al., 2002. Comparação do desempenho de atividades funcionais em crianças com desenvolvimento normal e crianças com paralisia cerebral [Comparison of functional activity performance in normally developing children and children with cerebral palsy]. *Arq Neuropsiquiatr.* 60 (2-B), 446-52. PMID: 12131948.
- Makris, T., Dorstyn, D., Crettenden, A., 2021. Quality of life in children and adolescents with cerebral palsy: a systematic review with meta-analysis. *Disabil Rehabil.* 43 (3), 299-308. <https://doi.org/10.1080/09638288.2019.1623852>.
- Marcuzzo, S., et al., 2010. Different effects of anoxia and hind-limb immobilization on sensorimotor development and cell numbers in the somatosensory cortex in rats. *Brain Dev.* 32 (4), 323-31. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2009.04.016>.
- Michael-Asalu, A., et al., 2019. Cerebral Palsy: Diagnosis, Epidemiology, Genetics, and Clinical Update. *Adv Pediatr.* 66, 189-208. <https://doi.org/10.1016/j.yapd.2019.04.002>.
- Mockford, M., Caulton, J.M., 2010. The pathophysiological basis of weakness in children with cerebral palsy. *Pediatr Phys Ther.* 22 (2), 222-33. <https://doi.org/10.1097/PEP.0b013e3181dbaf96>.

Nikawa, T., Ulla, A., Sakakibara, I., 2021. Polyphenols and Their Effects on Muscle Atrophy and Muscle Health. *Molecules*. 26 (16), 4887. <https://doi.org/10.3390/molecules26164887>.

Oskoui, M., et al., 2013. An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol*. 55 (6), 509-19. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12080>.

Palacz-Wrobel, M., et al., 2017. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in RAW-264.7 macrophages. *Biomed Pharmacother*. 93, 1205-1212. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.054>.

Pallàs, M., et al., 2013. Resveratrol: new avenues for a natural compound in neuroprotection. *Curr Pharm Des*. 19 (38), 6726-31. <https://doi.org/10.2174/1381612811319380005>.

Pan, S., et al., 2016. Resveratrol post-treatment protects against neonatal brain injury after hypoxia-ischemia. *Oncotarget*. 7 (48), 79247-79261. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13018>.

Pereira, S.D.C., et., 2021. Fibroblast growth factor 19 as a countermeasure to muscle and locomotion dysfunctions in experimental cerebral palsy. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 12 (6), 2122-2133. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12819>.

Peterson, M.D., Gordon, P.M., Hurvitz, E.A., 2012. Chronic disease risk among adults with cerebral palsy: the role of premature sarcopenia, obesity and sedentary behaviour. *Obes Rev*. 14 (2), 171-82. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2012.01052.x>.

Rebas, E., etl a., 2020. Neuroprotective polyphenols: A modulatory action on neurotransmitter pathways. *Current neuropharmacology*, 18 (5), 431-445. <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200106155127>.

Stavsky, M., et al., 2017. Cerebral Palsy-Trends in Epidemiology and Recent Development in Prenatal Mechanisms of Disease, Treatment, and Prevention. *Front Pediatr*. 5, 21. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00021>.

Stigger, F., et al., 2011. Effects of fetal exposure to lipopolysaccharide, perinatal anoxia and sensorimotor restriction on motor skills and musculoskeletal tissue: implications for an animal model of cerebral palsy. *Exp Neurol*. 228 (2), 183-91. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.001>.

Strata, F., et al., 2004. Effects of sensorimotor restriction and anoxia on gait and motor cortex organization: implications for a rodent model of cerebral palsy. *Neuroscience*. 129 (1), 141-56. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.024>.

Sewell, M.D., Eastwood, D.M., Wimalasundera, N., 2014. Managing common symptoms of cerebral palsy in children. *BMJ*. 349, g5474. <https://doi.org/10.1136/bmj.g5474>.

Silva, K.O., et al., 2016. Effects of maternal low-protein diet on parameters of locomotor activity in a rat model of cerebral palsy. *Int J Dev Neurosci.* 52 38-45. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.05.002>.

Toscano, A.E., Manhães-de-Castro, R., Canon, F., 2008. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition.* 24 (3), 270-8. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.12.004>.

Toso, L., et al., 2005. Inflammatory-mediated model of cerebral palsy with developmental sequelae. *Am J Obstet Gynecol.* 193 (3pt2), 933-41. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.05.072>.

Wang, R., et al., 2014. O resveratrol protege os neurônios e o miocárdio reduzindo o estresse oxidativo e melhorando o dano mitocondrial em um modelo de isquemia cerebral em ratos. *Cell Physiol Biochem.* 34 (3), 854–864. <https://doi.org/10.1159/000366304>.

Walhain, F., et al., 2021. Interventions and lower-limb macroscopic muscle morphology in children with spastic cerebral palsy: a scoping review. *Dev Med Child Neurol.* 63 (3), 274-286. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14652>.

West-Eberhard, M.J., 1986. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83 (5), 1388-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.5.1388>.

Wolan-Nieroda, A., et al., 2022. Assessment of Functional Performance in Children with Cerebral Palsy Receiving Treatment in a Day Care Facility: An Observational Study. *Med Sci Monit.* 28, e936207. <https://doi.org/10.12659/MSM.936207>.

Apêndices

APÊNDICE B

FICHA DE AVALIAÇÃO DOS REFLEXOS

NINHADA Nº: _____ IDENTIDADE: _____

DN: ____/____/____ GRUPO: _____

NINHADA Nº: _____ IDENTIDADE: _____

DN: ____/____/____ GRUPO: _____

Dia	Data							
		PP	RD	CVib	AP	RS	GN	QL
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								

(*) = dias de avaliação com o mesmo sinal

Dia	Data							
		PP	RD	CVib	AP	RS	GN	QL
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								

(*) = dias de avaliação com o mesmo sinal

Apêndices

APÊNDICE C

PROTOCOLO DE DESENVOLVIMENTO

1. Desenvolvimento murinométrico:

Avaliado as idades 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 pós-natal

Medida de comprimento em cm com paquímetro:

- Comprimento da cauda (CC)
- Eixo látero-lateral do crânio (ELLC)
- Eixo ântero-posterior do crânio (EAPC)
- Eixo longitudinal (EL)

2. Maturação das características somáticas:

Observado do 1° ao 21° dia pós-natal até a maturação completa da característica física.

Sendo + = maturação completa ou - = maturação incompleta:

- Abertura do pavilhão auditivo (APA)
- Abertura do conduto auditivo (ACA)
- Erupção dos incisivos inferiores (EII)
- Erupção dos incisivos superiores (EIS)
- Abertura dos olhos (AO)

3. Ontogênese dos reflexos:

Analisar do 1° ao 21° dia pós-natal o aparecimento e desaparecimento de reflexos relacionados à maturação motora. Para cada reflexo, o dia da consolidação será considerado o primeiro dia da sequência de três dias consecutivos de aparecimento completo da resposta reflexa esperada.

- Preensão palmar (PP)

- Recuperação de decúbito (RD)
- Colocação pelas vibrissas (CV)
- Aversão ao precipício (AP)
- Resposta ao susto (RS)
- Geotaxia negativa (GN)
- Queda livre (QL)

3.1 Preensão palmar:

Foi realizada uma leve percussão na palma da pata dianteira esquerda de cada animal, utilizando um bastonete de metal, com aproximadamente 5 cm de comprimento e 1mm de diâmetro. A resposta foi considerada positiva, caso houvesse uma flexão rápida dos dedos após duas tentativas. Nessa avaliação, em especial, foi observado o desaparecimento do reflexo.

3.2 Recuperação de decúbito:

O animal foi colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana. Foi considerada resposta positiva quando o ele girou o corpo e assumiu o decúbito ventral apoiado nas quatro patas, num período máximo de 10 segundos.

3.3 Colocação pelas vibrissas:

O rato foi suspenso pela cauda de uma forma que suas vibrissas tocassem a borda de uma mesa. A resposta foi considerada positiva quando o animal colocou as patas anteriores sobre a mesa tentando caminhar, no tempo máximo de 10 segundos.

3.4 Aversão ao precipício:

O animal foi colocado com as patas dianteiras sobre a borda de uma superfície plana e alta (mesa) de maneira a detectar o precipício. A resposta foi considerada positiva quando o animal, no tempo máximo de 10s, deslocou 45° do precipício, caracterizando a aversão.

3.5 Resposta ao susto:

O rato foi submetido a um estampido agudo, produzido pela percussão de um bastão metálico sobre um recipiente (4,5 cm de diâmetro x 6 cm de altura) também metálico e oco, a uma distância aproximada de 10 cm do animal. A resposta foi

considerada positiva, quando ocorreu uma simultânea e rápida retração com a imobilização involuntária do corpo do animal, característica de susto.

3.6 Geotaxia negativa:

O animal foi colocado no centro de uma rampa de 45° de inclinação revestida com papel crepom, com a cabeça no sentido descendente. A resposta reflexa foi considerada positiva quando o animal, num período máximo de 10 segundos, voltar completamente, girando o corpo em aproximadamente 140°, posicionando a cabeça em sentido ascendente.

3.7 Queda livre:

O rato foi segurado pelas quatro patas com o dorso voltado para baixo, a uma altura de 30 cm (uma régua de 30 cm, perpendicular ao plano serviu como guia). O animal foi solto e observado sua queda livre sobre um leito de algodão (30 x 12 cm). A resposta foi considerada positiva quando o animal girou completamente o corpo, voltando o ventre para baixo, caindo na superfície apoiado sobre as quatro patas.