



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E CIÊNCIAS DO
COMPORTAMENTO

ISLA ARIADNY AMARAL DE SOUZA GONZAGA PAZ

Paralisia cerebral experimental: efeitos da suplementação com creatina associada ao treinamento de resistência sobre o desenvolvimento ósseo e do sistema nervoso periférico.

Recife

2021

ISLA ARIADNY AMARAL DE SOUZA GONZAGA PAZ

Paralisia cerebral experimental: efeitos da suplementação com creatina associada ao treinamento de resistência sobre o desenvolvimento ósseo e do sistema nervoso periférico.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Neurociência.

Área de concentração: Neurociência

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

Recife

2021

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Gonzaga, Isla Ariadny Amaral de Souza.

Paralisia cerebral experimental: efeitos da suplementação com creatina associada ao treinamento de resistência sobre o desenvolvimento ósseo e do sistema nervoso periférico / Paz, Isla Ariadny Amaral de Souza Gonzaga. - Recife, 2021.
88f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, 2021.

Orientação: Ana Elisa Toscano Meneses da Silva Castro. Inclui referências e apêndices.

1. Plasticidade fenotípica; 2. Paralisia cerebral; 3. Exercício Físico; 4. Creatina; 5. Neuroproteção. I. Castro, Ana Elisa Toscano Meneses da Silva. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

RESUMO

Durante a vida útil de mamíferos superiores o sistema nervoso central pode se adaptar a mudanças no ambiente, por ser uma estrutura altamente plástica. A paralisia cerebral (PC) compreende condições neurológicas caracterizadas por anormalidades no movimento, postura corporal e tônus muscular, sendo a atrofia e osteoporose duas das principais consequências. Devido ao fato de a descoberta de mecanismos subjacentes ao efeito anabólico e neuroprotetor, a creatina passou a ser considerada para o tratamento de doenças neurodegenerativas que apresentam atrofia muscular e degeneração óssea. Além disso, quando combinado com uma nutrição adequada, o exercício resistido pode aumentar a força e amassa muscular. Assim, no presente projeto, avaliamos os efeitos da creatina, associada ou não ao exercício físico, sobre o desenvolvimento neuromúsculoesquelético em modelo de paralisia cerebral. Foram utilizados filhotes machos da linhagem Wistar. Os filhotes foram submetidos a dois episódios de anóxia, no P0 e P1. Do P2 ao P28 foi realizada a restrição sensório-motora durante 16 horas, e nas 8 horas restantes foi permitida a livre movimentação do animal. Após o início da suplementação de creatina (300mg/kg/dia) e do programa de treinamento resistido, os seguintes grupos foram formados: 1) Controle água não treinado (C-A-NT, n=11); 2) Controle água treinado (C-A-T, n=11); 3) Controle creatina não treinado (C-CR-NT, n=11); 4) Controle creatina treinado (C-CR-T, n=11); 5) Paralisia cerebral água não treinado (PC-A-NT, n=11); 6) Paralisia cerebral água treinado (PC-A-T, n=11); 7) Paralisia cerebral creatina não treinado (PC-CR-NT, n=11); 8) Paralisia cerebral creatina treinado (PC-CR-T, n=11). Em seguida, foram avaliados: o peso corporal, o consumo alimentar, a força muscular máxima, a locomoção avaliada por catwalk, a capacidade de realizar o treinamento resistido, o peso e comprimento da tíbia e a morfologia do nervo ciático. Nossos resultados demonstraram que a PC ocasionou: redução do peso corporal no período pós-natal, diminuição da força muscular máxima, aumento do tempo necessário para realizar uma série no treinamento resistido e prejuízos na locomoção. Por outro lado, a suplementação de creatina, nos animais com PC ocasionou aumento do peso corporal, da força muscular e da área máxima de contato com a plataforma do catwalk. Ainda, nos animais controle, a suplementação com creatina aumentou o peso corporal e consumo alimentar. A suplementação de creatina pode melhorar os danos motores associados à paralisia cerebral principalmente quando aplicada no período crítico do desenvolvimento.

Palavras-chave: Plasticidade fenotípica. Paralisia cerebral. Exercício Físico. Creatina. Neuroproteção.

ABSTRACT

[20:22, 10/12/2021] Amor: During the shelf life of higher mammals, the central nervous system can adapt to changes in the environment, because it is a highly plastic structure. Cerebral palsy (CP) comprises neurological conditions characterized by abnormalities in movement, body posture and muscle tone, with atrophy and osteoporosis being two of the main consequences. Due to the discovery of mechanisms underlying the anabolic and neuroprotective effect, creatine has come to be considered for the treatment of neurodegenerative diseases that present muscle atrophy and bone degeneration. In addition, when combined with proper nutrition, resistance exercise can increase muscle strength and kneading. Thus, in the present project, we evaluated the effects of creatine, associated or not with physical exercise, on neuromusculoskeletal development in a model of cerebral palsy. Male Wistar puppies were used. The pups underwent two episodes of anoxia, in P0 and P1. From P2 to P28 sensorimotor restriction was performed for 16 hours, and in the remaining 8 hours the free movement of the animal was allowed. After the start of creatine supplementation (300mg/kg/day) and the resistance training program, the following groups were formed: 1) Untrained water control (C-A-NT, n=11); 2) Trained water control (C-A-T, n=11); 3) Untrained creatine control (C-CR-NT, n=11); 4) Trained creatine control (C-CR-T, n=11); 5) Untrained water cerebral palsy (PC-A-NT, n=11); 6) Trained water cerebral palsy (PC-A-T, n=11); 7) Untrained creatine cerebral palsy (PC-CR-NT, n=11); 8) Trained creatine cerebral palsy (PC-CR-T, n=11). Then, the following were evaluated: body weight, food consumption, maximum muscle strength, locomotion evaluated by catwalk, ability to perform resistance training, tibial weight and length and sciatic nerve morphology. Our results showed that CP caused: reduction of body weight in the postnatal period, decrease in maximum muscle strength, increase in the time required to perform a series in resistance training and losses in locomotion. On the other hand, creatine supplementation in animals with CP caused an increase in body weight, muscle strength and maximum area of contact with the catwalk platform. Also, in control animals, creatine supplementation increased body weight and food consumption. Creatine supplementation can improve the motor damage associated with cerebral palsy especially when applied in the critical period of development.

Keywords: Phenotypic plasticity. Cerebral palsy. Physical Exercise. Creatine. Neuroprotection.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
Plasticidade Fenotípica	10
Paralisia Cerebral.....	11
Desenvolvimento Ósseo	14
Desenvolvimento do Sistema Nervoso Periférico.....	15
Benefícios da suplementação alimentar com creatina	16
Benefícios do Exercício físico	19
3. HIPÓTESE	21
4. OBJETIVOS	22
Objetivo geral	22
Objetivos específicos	22
5. MATERIAIS	E
MÉTODOS.....	23
Animais.	23
Anóxia Perinatal e Restrição Sensorio-motora.....	23
Tratamento com creatina	24
Tratamento com exercício de resistência	24
Grupos experimentais	25
Análises Experimentais	26
6. RESULTADOS	30
7. DISCUSSÃO	42
8. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS	46

1- INTRODUÇÃO

Ao longo de sua vida útil o sistema nervoso central de mamíferos superiores pode se adaptar a mudanças no ambiente, por ser uma estrutura altamente plástica. Durante o período embrionário e durante os primeiros estágios pós-natais, o estabelecimento da conectividade neural está sob controle genético e epigenético. Em particular durante o período crítico, os fatores ambientais, podem exercer forte influência na organização do cérebro, tanto a curto quanto em longo prazo (CANU et al., 2012).

O fenótipo de um indivíduo é a expressão última da interação do seu genótipo (conjunto de genes) e do ambiente (WEST-EBERHARD et al. 2003), estrutura e forma (PIGLIUCCI et al., 2006). Um dos fatores mais bem documentado no estudo da plasticidade fenotípica são os fatores nutricionais (DE MOURA et al., 2008). A mudança na qualidade e/ou quantidade do aporte nutricional durante períodos críticos do desenvolvimento, pode resultar em alterações permanentes na estrutura e função de órgãos (TOSCANO et al., 2008; FERRAZ-PEREIRA et al., 2015), como a paralisia cerebral (BAX, FLODMARK e TYDEMAN, 2007). Além disso, variados são os fatores de riscos que podem levar à PC, como nascimento pré-termo, baixo peso ao nascer, malformações, traumas, infecções maternas, asfixia, quedas, entre outros.

Paralisia cerebral descreve um grupo de condições neurodesenvolvimentais não progressivas heterogêneas que afetam o cérebro fetal ou infantil (BAX, FLODMARK e TYDEMAN, 2007; ROSENBAUM et al., 2007), incluindo desordens posturais e de movimento que levam a limitação da atividade (KRIGGER, 2006). Recente metanálise encontrou que a prevalência mundial de paralisia cerebral é de aproximadamente 2 a cada 1000 nascidos (OSKOUI et al., 2013). Os efeitos patológicos da paralisia cerebral podem mudar com o tempo (BLAIR, BADAWI e WATSON, 2007), mas os acometimentos chave são espasticidade, atrofia e fraqueza muscular, desordens de movimento, ataxia, rigidez, marcha em tesoura e reflexos patológicos aumentados (KRIGGER, 2006). Num modelo experimental de paralisia cerebral, os animais apresentam alterações no padrão de marcha, nos reflexos motores e no desenvolvimento da locomoção (STRATA et al., 2004; SILVA et al., 2016).

Também foi observado menor peso corporal e massa muscular relativa, sugerindo atrofia muscular (MARCUIZZO et al., 2008; SILVA et al., 2016). Desta forma, sugere-se que a paralisia cerebral afeta a manutenção da massa muscular (STRATA et al., 2004; MARCUIZZO et al., 2008), o que pode ocorrer pelo aumento da degradação protéica ou redução da síntese protéica muscular (ATHERTON et al., 2016). Além disso, a paralisia cerebral é a condição infantil mais prevalente associada à osteoporose (HOULIHAN; STEVENSON, 2009). A densidade óssea é significativamente diminuída, e as crianças com paralisia cerebral frequentemente apresentam fraturas dolorosas com traumas que prejudicam sua função e qualidade de vida (BISCHOF; BASU; PETTIFOR, 2002; LOHIYA; CRINELLA; TANFIGUEROA, 1999). Assim, prevenir ou melhorar a osteoporose e maximizar a acumulação óssea durante os estágios críticos do crescimento minimizará os futuros riscos de fraturas em crianças com paralisia cerebral ao longo da vida. A creatina, composto formado por três aminoácidos (glicina, arginina e metionina) (WALKER, 1979), surge como um candidato.

Evidências sugerem que a suplementação de creatina pode apresentar efeitos benéficos no tecido ósseo (GERBER et al., 2005; CHANG et al., 2008; ANTOLIC et al., 2007). Experimentos *in vitro* mostraram que o sistema fosforilcreatina (PCr) desempenha um papel energético fundamental na diferenciação e ativação de células semelhantes aos osteoblastos (GERBER et al., 2005). Um estudo proteômico indicou que a creatina quinase (CK) citoplasmática cerebral apresentou-se elevada durante a osteoclastogênese, revelando um papel importante da CK na reabsorção óssea dos osteoclastos (CHANG et al., 2008). Estudos experimentais revelaram que a suplementação de creatina pode melhorar os parâmetros biomecânicos ósseos e a densidade mineral óssea (DMO) em ratos Sprague-Dawley (ANTOLIC et al., 2007). Além disso, a creatina está associada ao aumento de força e massa muscular (FARSHIDFAR et al., 2017), e neuroproteção, relatada em estudos *in vitro* e *in vivo* (BENDER et al. 2005; GENIUS et al. 2012; LAWLER et al. 2002; O'GORMAN et al. 1997). Os mecanismos relacionados ao aumento de força e massa muscular são diversos, dentre eles, ativação da via alvo de rapamicina em mamíferos, conhecida como mTOR (SAKKAS et al., 2009; WALL; VAN LOON, 2013; DELDICQUE et al., 2007), estímulo anabólico pelo efeito osmótico (SAFDAR et al., 2008) e secreção de miocinas e expressão de fatores

regulatórios miogênicos (WILLOUGHBY; ROSENE, 2003). Já os mecanismos pelos quais esta substância está relacionada à neuro proteção envolvem propriedades anti-apoptótica, anti-excitotóxica e antioxidante (BENDER et al. 2005; GENIUS et al. 2012; LAWLER et al. 2002; O’GORMAN et al. 1997). De fato, estudos indicaram que a utilização da creatina pode resultar em benefícios para desordens neuro degenerativas como Alzheimer, Parkinson e doença de Huntington (BEAL, 2011; ROSAS et al., 2014; BREWER; WALLIMMAN, 2000; VIS et al., 2004; MATTHEWS et al., 1998; MATTHEWS et al., 1999).

Por sua vez, o exercício é um importante estimulador da remodelação óssea e muscular (EGAN; ZIERATH, 2013; MOREIRA et al., 2014). Evidências indicam que uma das formas de estimular o metabolismo ósseo através de exercício é utilizando exercícios de resistência (MOREIRA et al., 2014). 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). Este tipo de treinamento gera um estímulo capaz de promover uma resposta osteogênica (TURNER; ROBLING, 2005). Este mecanismo promove ações como tensão, compressão e torção, criando sinais elétricos capazes de estimular o metabolismo ósseo, aumentando a densidade mineral óssea e possivelmente inibindo a reabsorção óssea (MENKES et al., 1985; IWAMOTO et al., 2013).

Além disso, um grande corpo de evidências tem demonstrado que o exercício físico tem surgido como uma das principais abordagens terapêuticas não cirúrgicas para recuperação da lesão nervosa periférica. Várias modalidades de exercício têm sido utilizadas na recuperação da lesão nervosa periférica para auxiliar na recuperação funcional e para auxiliar na manutenção das propriedades musculares durante a paralisia. No entanto ainda faltam trabalhos que padronizem o protocolo de exercício a ser utilizado e os resultados estão relacionados estritamente a intensidade dos exercícios e a duração e número de repetições a ser utilizado. Desta forma, indivíduos portadores de paralisia cerebral podem se beneficiar da suplementação de creatina associada ao exercício devido aos seus benefícios no metabolismo ósseo e nervoso periférico.

O tratamento da paralisia cerebral foca no acompanhamento da patologia já instalada, e não na reversão do problema, desta forma, nenhum dos tratamentos

atuais propostos corrige o problema (BUDHDEO e RAJAPAKSA, 2011). Assim pretendemos explorar essa perspectiva de prováveis benefícios da creatina associada ao exercício físico sobre o desenvolvimento ósseo e nervoso periférico em modelo animal de paralisia cerebral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Plasticidade fenotípica

De forma geral há períodos em que os sistemas fisiológicos dos mamíferos passam por períodos de maior vulnerabilidade a agravos químicos, físicos e biológicos (RICE; BARONE, 2000). Essas etapas dependem de processos referentes ao desenvolvimento neural, tais como proliferação, migração, diferenciação, sinaptogênese, mielinização e apoptose (RICE; BARONE, 2000). A importância que as modificações ambientais podem exercer durante as fases precoces de desenvolvimento humano e suas consequências em longo prazo vem sendo estudadas no campo de atuação da plasticidade neural (JONES; DYSON, 1981). Assim, diversos distúrbios neurológicos podem ser resultado de algum agravo ocorrido no ambiente durante seu desenvolvimento (BAX *et al.*, 2005). Apesar disso, as espécies tem demonstrado boa capacidade de reação através de adaptações genéticas, fisiológicas, bioquímicas, e morfológicas as diversas injúrias ambientais (WEST-EBERHARD, 1986; PIGLIUCCI *et al.*, 2006). Esta capacidade demonstrada tem sido de grande valor, pois tem garantido maior sobrevivência e sucesso reprodutivo da maioria das espécies animais e vegetais (WEST-EBERHARD, 1986; WEST-EBERHARD, 2003)

É neste contexto que nasce a definição de plasticidade fenotípica que diz que um genótipo pode expressar mais de um fenótipo, dependendo da sua interação com o ambiente, modificando suas características como, forma, movimento e padrão de atividade (GARLAND; KELLY, 2006; PIGLIUCCI *et al.*, 2006). O fenótipo de um indivíduo é a expressão última da interação do seu genótipo (conjunto de genes) e do ambiente (WEST-EBERHARD, 1986; WEST-EBERHARD, 2003; PIGLIUCCI *et al.*, 2006).

Alguns pesquisadores consideram o período de formação como preditor no desenvolvimento dos mamíferos, pois o período de crescimento e desenvolvimento é um momento de vulnerabilidade a fatores ambientais que manifestarão consequências a curto e longo prazo que poderão se estender até a vida adulta (GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007). Tudo isso contribui com o que foi dito em estudos epidemiológicos e experimentais, que modificações do ambiente no início da vida podem originar alterações no fenótipo com permanentes repercussões no

metabolismo, estrutura e função dos sistemas fisiológicos (HALES *et al.*, 1991; TOSCANO *et al.*, 2008). Vale salientar que essas condições envolvem um grupo de origens diferentes no que diz respeito aos sinais clínicos e a seriedade do comprometimento. Sobre isso se incluem os fatores pré-natais (infecções congênitas, falta de oxigenação etc.); fatores perinatais (anóxia neonatal, eclâmpsia etc.); e fatores pós-natais (infecções, traumas etc.) (PIOVESANA *et al.*, 2002). Sendo este o caso da Paralisia Cerebral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Paralisia cerebral

Descrita inicialmente na Inglaterra, em 1843, por John Little, a paralisia cerebral foi relatada como um quadro clínico de espasticidade, através de um estudo desenvolvido com 47 crianças as quais apresentavam quadros diferenciados de complicações ao nascimento, tais como (1) apresentação pélvica, (2) prematuridade, (3) dificuldade no trabalho de parto, (4) demora em chorar e respirar ao nascer, e (5) convulsões e coma nas primeiras horas de vida (PIOVESANA *et al.*, 2002; MORRIS, 2007). E em 1893 Sigmund Freud identificou três fatores principais como causa: (1) materno e congênito (pré-natal), (2) perinatal e (3) pós-natal (MORRIS, 2007).

A Etiologia desta doença ainda é algo muito discutido e motivo de diferentes tipos de investigação em diversos países que tentam encontrar um fator que seja determinante para o surgimento da PC. Diversos fatores de risco interagem entre si, sugerindo que essa é uma doença multifatorial, sendo assim, não foi encontrada nenhuma causa específica para ela (PATO, 2002). Diversos campos da saúde têm buscado estudar e propor terapias no intuito de prevenir e minimizar as consequências das lesões cerebrais, além de potencializar as suas capacidades. Hoje, os estudos sobre neonatologia tem avançado, o que permite diminuir de forma significativa o risco de morte de recém nascidos, os quais podem desenvolver comorbidades com maior risco relacionados a dificuldade de desenvolvimento (CANS *et al.*, 2007; GAMA, FERRACIOLI, CORRÊA, 2004). Esta condição acomete duas a cada mil crianças em países desenvolvidos, sendo a causa mais comum de incapacidade motora crônica na infância (HIMMELMANN, 2013). Contudo, vale ressaltar que em países em desenvolvimento a incidência é maior, pois esses países reúnem condições mais favoráveis à ocorrência de problemas crônicos como

a PC (HIMMELMANN, 2013). 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). Recente metanálise encontrou que a prevalência mundial de Paralisia Cerebral é de aproximadamente 2 a cada 1000 nascidos (OSKOU et al., 2013), tornando-se o motivo mais comum de deficiência física grave na infância (O'SHEA, 2008; CANS et al., 2007).

Em recente revisão, Lacerda et al. (2017) demonstraram que os distúrbios orofaciais são encontrados em todos os modelos experimentais, em diferentes espécies, de paralisia cerebral, o que pode ocasionar deficiências nutricionais (LACERDA et al., 2017a). Além disso, deficiências nutricionais também podem ser ocasionadas pelos distúrbios da marcha (LACERDA et al., 2017b; SILVA et al., 2016). Estas deficiências podem induzir efeitos permanentes sobre o desenvolvimento neural e imunológico, no comportamento alimentar, na aprendizagem e no desenvolvimento e propriedades do músculo esquelético/metabolismo energético (GEORGIEFF, 2007; MARQUES et al., 2013; OROZCO-SOLÍS et al., 2011; TOSCANO; MANHÃES-DE-CASTRO; CANON, 2008).

Assim, a paralisia cerebral é uma condição abrangente que envolve diversas condições etiológicas e uma série de distúrbios que limitam a dependência funcional (CLOWRY; BASUODAN; CHAN, 2014).

Novas modificações na área da saúde retiram seu foco da doença e passam a centrar-se no indivíduo, no que cerne a identificação do impacto funcional como consequência de condições como a paralisia cerebral (MANCINI, 2011). Essas modificações são resultado da ampliação de novos padrões de classificação, métodos avaliativos e intervenções que induzam a interação da pessoa com o ambiente, tornando mais amplo e mais completo os parâmetros de atenção a saúde da pessoa com paralisia cerebral (ROSENBAUM et al., 2007; MANCINI et al., 2012).

A paralisia Cerebral também pode ser chamada de encefalopatia crônica não progressiva. Refere-se a um grupo heterogêneo de condições que se desenvolvem com alterações motoras centrais, afetando a postura, os movimentos e o tônus muscular, tornando-se a causa mais frequente de deficiência motora na infância. É decorrente de danos permanentes no cérebro durante o seu desenvolvimento e se

apresenta de diversas formas com relação à distribuição corporal da lesão, e sintomas clínicos associados (PEREIRA, 2018).

As Crianças com PC têm como principal característica três fatores que influenciam no seu desempenho funcional: comprometimento motor, postural e do tônus muscular. A PC pode ser classificada pelo tipo de disfunção motora e pelo tipo de topografia dos prejuízos. Sobre a disfunção motora inclui-se os tipos extrapiramidal ou discinético (atetóide, coréico e distônico), atáxico, hipotônico e piramidal ou espástico e sobre a topografia inclui-se a tetraplegia ou quadriplegia, monoplegia, paraplegia ou diplegia e hemiplegia, ou seja, está muito mais relacionado a localização corporal afetada, enquanto a anterior está relacionada ao quadro clínico resultante (DOS SANTOS, 2014).

Distúrbios sensoriais, de percepção, cognitivos, comportamentais e de comunicação, podem acompanhar as desordens motoras da PC, além de epilepsia e problemas músculo esqueléticos secundários (ROSENBAUM et al., 2007). Estes distúrbios podem estar presentes ou não, assim como pode existir ou não a associação entre distúrbios motores e cognitivos, podendo ser diminuídos com a utilização de instrumentos adequados a pessoa com PC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Dessa forma existe a necessidade de que esses pacientes e seus familiares sejam abordados de forma ordenada em um conceito mais amplo de saúde (PEREIRA, 2018).

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). Entretanto, apesar de reproduzirem danos semelhantes como injúrias na matéria branca ao redor dos ventrículos, estes modelos reproduzem apenas alterações motoras leves (HOEGER et al., 2000; LUBICS et al., 2005; ROBINSON et al., 2005). Por outro lado, modelos experimentais induzidos por desuso 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. 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. Por outro lado, a asfixia perinatal causou apenas alterações leves sobre o tônus muscular, desempenho motor e organização cortical (Coq et al., 2008). Assim, a associação de asfixia perinatal e desuso muscular por restrição sensório-motora mostrou ser um modelo simples, eficaz e reproduzível de um fenótipo motor semelhante aos portadores humanos de PC.

Desenvolvimento ósseo

O osso possui um tecido ativo, em constante modificação; tem como principais funções a proteção de órgãos, armazenamento de íons, apoio de músculos, suporte de partes moles e produção de células sanguíneas. É um tipo de tecido conjuntivo especializado, formado por células calcificadas (BERTOLINE, 2008). Segundo a lei de Wolff as mudanças ocorridas na função proporcionam também mudanças na conformação óssea externa e interna. O exercício dinâmico pode aumentar ou diminuir o peso e o comprimento do osso. Esses são fatores que dependem de algumas características do próprio indivíduo como, idade e gênero. Além de características do exercício, como intensidade, duração e o tipo de exercício realizado (BERTOLINE, 2008).

A Imobilidade, ou seja, a falta de atividade, fraqueza ou lesão neuromuscular também afetam o tecido ósseo. Após longos períodos de imobilização passa a acontecer a perda de propriedades ósseas, como é o caso da PC, a sua recuperação varia com o tipo de imobilização, a idade, e o tipo do osso (BERTOLINE, 2008). A paralisia cerebral (PC) é a forma mais comum de incapacidade motora crônica em crianças. Assim como outras causas como, estado nutricional e uso excessivo de anticonvulsivantes. Estes fatores estão diretamente relacionados ao comprometimento do desenvolvimento ósseo em crianças (SCHEINBERG *et al.*, 2015).

Alguns autores sugerem que é comum na PC a baixa ingestão de cálcio, além de uma inadequada mineralização óssea, assim, crianças com PC grave geralmente apresentam baixa densidade mineral óssea com risco de fraturas aos mínimos esforços (SCHEINBERG *et al.*, 2015). No entanto, pelo fato de crianças estarem em

constante crescimento, torna-se mais difícil a interpretação das medidas minerais ósseas em crianças do que em adultos, dessa forma ainda não está bem estabelecida a relação entre o risco de fraturas e a densidade mineral óssea de crianças. Assim, alguns pesquisadores relatam não está esclarecida essa relação entre o surgimento de lesões e diminuição da massa óssea secundária ao desuso que tem sido muito relatada em diversas doenças infantis, e a PC tem sido uma das mais prevalentes desse grupo (SCHEINBERG *et al.*, 2015).

Desenvolvimento do sistema nervoso periférico

O Sistema Nervoso é o sistema mais complexo do corpo humano. Ele é o responsável por manter o nosso meio interno em equilíbrio e pelo desenvolvimento dos nossos reflexos; além de participar da geração de comportamentos alimentares, sono, vigília, luta, defesa, fuga, comportamentos reprodutivos, entre outros (BERNE, 2004; GUYTON, 2002). O SN divide-se se baseando tanto em características funcionais como anatômicas. Com relação às características funcionais temos o sistema nervoso somático e o sistema nervoso visceral ou vegetativo (SILVERTHORN, 2003). O primeiro relaciona-se ao que é consciente e o segundo ao que é inconsciente, ou seja, na percepção do meio interno e vísceras. Quanto aos critérios anatômicos o sistema nervoso divide-se em Central, que é a porção que se localiza no crânio e a medula espinhal (GUYTON, 2002) e em Sistema Nervoso periférico, constituído por gânglios nervosos e fibras nervosas que são prolongamentos do SNC (CARLOS, 2012).

O SNP recebe informações do SNC e as transmite aos órgãos efetores, e isto realiza uma comunicação entre o meio interno e externo; além de fornecer informações sobre o estado desses órgãos. Duas vias tornam possível essa comunicação, as vias aferentes e eferentes. Na primeira o impulso é gerado nos receptores e transmitido ao SNC, já no segundo é basicamente o inverso, o impulso é gerado na soma neural e é transmitido ao longo do axônio até o órgão efector (BARROS, 2002). Macroscopicamente, os nervos do SNP são unidos por tecido conjuntivo, e apresentam-se como feixes ou fascículos brancos e brilhantes (CARLOS, 2012). A arquitetura de um nervo periférico de forma geral ela é intrincada e isso observa-se com a realização de cortes no tecido (MIRSKY & JESSEN, 2001). Dentre os vários tipos celulares que constituem esse sistema

encontramos as células de Schwann, que se localizam em compartimentos endoneurais, assim como os axônios, e são rodeados pelo Perineuro, estes formam fascículos individuais e são envolvidos pelo epineuro (ORTIZHIDALGO & WELLER, 1997).

As células de Schwann tem como uma de suas funções mielinizar os axônios do SNP e lá elas são confinadas, sendo vistas de forma muito rara no SNC. São células extremamente instáveis, mas que exercem um papel fundamental na formação dos nervos, auxiliando o sistema nervoso de forma geral nos processos de regeneração (MIRSKY & JESSEN, 2001). Tanto pela quantidade existente, como pela sua distribuição anatômica, o SNP, que é composto por prolongamentos oriundo do SNC, torna-se um alvo mais fácil de possíveis lesões. Os axônios mielinizados também sofrem desintegração chegando ao ponto de desnervar o órgão efetor.

Benefícios da suplementação alimentar com creatina

Descoberta em 1832 por Michel Eugene Chevreul, a creatina (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 (WALKER, 1979), ela pode ser obtida pela alimentação a partir de alimentos como carne, peixe e sementes (PERSKY; BRAZEAU, 2001). A primeira etapa da produção endógena da creatina acontece nos rins, a partir dos aminoácidos glicina e arginina, com formação da ornitina e ácido guanidinoacético, enquanto a segunda etapa ocorre no fígado, a partir da doação do grupo metil do aminoácido metionina (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 creatina 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 creatina 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 creatina é fosforilada pela enzima creatina quinase, formando a fosfocreatina ou creatina fosfato (PCr), enquanto 1/3 permanece na forma livre (WALZEL et al., 2002).

A PCr possui um importante papel no sistema energético fosfogênio 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). 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). Portanto, aumentando as reservas de fosfocreatina com a suplementação, a crença era de que se poderia diminuir a fadiga muscular e aumentar o desempenho.

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 creatina 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 creatina podem ser obtidos combinando o suplemento com exercício, carboidrato ou carboidrato/proteína, embora o acúmulo máximo de creatina em médio a longo prazo (ou seja, semanas a meses) parecer não ser afetado por nenhum desses fatores (HULTMAN et al., 1996). Entretanto, a suplementação de Cr na sua forma monohidratada (CM) também passou a ser considerada para o tratamento de

doenças neurodegenerativas que apresentam atrofia muscular ou fadiga secundária à produção de energia prejudicada (PERSKY; BRAZEAU, 2001). Isso se deve ao fato da descoberta de mecanismos subjacentes ao efeito anabólico e neuroprotetor da creatina (DOLAN; GUALANO; RAWSON, 2019).

Evidências sugerem que a suplementação de creatina pode apresentar efeitos benéficos no tecido ósseo (GERBER et al., 2005; CHANG et al., 2008; ANTOLIC et al., 2007). Experimentos *in vitro* mostraram que o sistema fosforilcreatina (PCr) desempenha um papel energético fundamental na diferenciação e ativação de células semelhantes aos osteoblastos (GERBER et al., 2005).

Um estudo proteômico indicou que a creatina quinase (CK) citoplasmática cerebral apresentou-se elevada durante a osteoclastogênese, revelando um papel importante da CK na reabsorção óssea dos osteoclastos (CHANG et al., 2008). Estudos experimentais revelaram que a suplementação de creatina pode melhorar os parâmetros biomecânicos ósseos e a densidade mineral óssea (DMO) em ratos Sprague-Dawley (ANTOLIC et al., 2007). Além disso, a creatina está associada ao aumento de força e massa muscular (FARSHIDFAR et al., 2017), e neuroproteção, relatada em estudos *in vitro* e *in vivo* (BENDER et al. 2005; GENIUS et al. 2012; LAWLER et al. 2002; O'GORMAN et al. 1997). Os mecanismos relacionados ao aumento de força e massa muscular são diversos, dentre eles, ativação da via alvo de rapamicina em mamíferos, conhecida como mTOR (SAKKAS et al., 2009; WALL; VAN LOON, 2013; DELDICQUE et al., 2007), estímulo anabólico pelo efeito osmótico (SAFDAR et al., 2008) e secreção de miocinas e expressão de fatores regulatórios miogênicos (WILLOUGHBY; ROSENE, 2003).

Com relação à neuroproteção atribuída a esta substância, estudos *in vitro* e *in vivo* relataram que a creatina 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 creatina 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 creatina 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 sobrevivência global (ANDREASSEN et al., 2001; FERRANTE et al., 2000). 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 creatina e o exercício resistido, torna-se essencial.

Benefícios do exercício físico

O exercício físico possui um papel muito importante no processo de estimulação da remodelação óssea e muscular (EGAN; ZIERATH, 2013; MOREIRA et al., 2014). Algumas evidências indicam que o exercício físico de resistência é uma das formas de se estimular o metabolismo ósseo (MOREIRA et al., 2014).

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). Este tipo de treinamento gera um estímulo capaz de promover uma resposta osteogênica (TURNER; ROBLING, 2005). Este mecanismo promove ações como tensão, compressão e torção, criando sinais elétricos capazes de estimular o metabolismo ósseo, aumentando a densidade mineral óssea e possivelmente inibindo a reabsorção óssea (MENKES et al., 1985; IWAMOTO et al., 2013).

Além disso, um grande corpo de evidências tem demonstrado que o exercício físico tem surgido como uma das principais abordagens terapêuticas não cirúrgicas

para recuperação da lesão nervosa periférica. Várias modalidades de exercício têm sido utilizadas na recuperação da lesão nervosa periférica para auxiliar na recuperação funcional e para auxiliar na manutenção das propriedades musculares durante a paralisia. No entanto ainda faltam trabalhos que padronizem o protocolo de exercício a ser utilizado e os resultados estão relacionadas estritamente a intensidade dos exercícios e a duração e número de repetições a ser utilizado.

Diversos estudos apresentaram o exercício físico como uma estratégia para diminuir o risco de doenças cardiovasculares, pulmonares, imunológicas, metabólicas e neuro degenerativas (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), 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, Gomes et al. (2014), relataram efeitos benéficos no giro denteado do hipocampo (NOVAES GOMES et al., 2014). Recente revisão, realizada por Guo et al. (2019), 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). Assim, visando primeiramente o remodelamento da musculatura esquelética e ganho de força muscular, mas também adaptações neuroquímicas, em indivíduos com PC, o foco deste trabalho é o exercício de resistência.

3. HIPÓTESE

Em ratos submetidos à paralisia cerebral, o tratamento com creatina associado a exercício físico resistido ou não reduz significativamente a perda de células nervosas do nervo ciático, aumenta o peso da tíbia melhorando as condições motoras na paralisia cerebral.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar as repercussões do tratamento com creatina, associadas ou não ao exercício resistido, em ratos submetidos à paralisia cerebral sobre o desenvolvimento ósseo e do sistema nervoso periférico.

Objetivos específicos

Na prole, em ratos submetidos à Paralisia cerebral (por restrição sensório-motora associada à anóxia perinatal) que receberão tratamento com creatina, associado ao exercício resistido, estudar: A) Caracterização somática; B) Consumo alimentar e hídrico; C) Análise da força muscular; D) Análise da marcha em CatWalk; E) Coleta do nervo periférico e processamento histológico; F) Análise morfológica e morfométrica do nervo ciático; G) Aferição do peso e comprimento da tíbia.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar*. 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 (20:00 as 8:00) e escuridão (08:00 às 20:00 h), temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e com livre acesso à água e ração, mantidos em gaiolas de polipropileno (46cm x 34cm x 20cm) 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. O diagnóstico de possível fertilização foi realizado através do teste de esfregaço vaginal com constatação do espermatozoide na secreção vaginal. A gestação foi confirmada por acompanhamento da evolução ponderal. O projeto segue 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 com 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 com número de processo 0011/2020 (ANEXO 1), tendo o mesmo início após aprovação.

ANÓXIA PERINATAL E RESTRIÇÃO SENSÓRIO-MOTORA

O modelo experimental de paralisia cerebral foi baseado nos experimentos de Strata et al. (2004), Coq et al. (2008) e Silva et al. (2016). Este modelo associa a anóxia perinatal a um modelo de restrição sensório-motora dos membros inferiores semelhante à falta de movimento ocorrida na Paralisia Cerebral. Ao nascer, os filhotes foram submetidos a dois episódios de anóxia, o primeiro ocorreu no dia do nascimento, considerado o P0 e o segundo, no segundo dia pós-natal, considerado o 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 às suas respectivas mães após tal procedimento. Do P2 ao P28 foi realizada a restrição sensório-motora durante 16 horas por dia (das 20h às 12h do dia seguinte), 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 foram permitidos, deixando os membros posteriores estendidos com o auxílio de fita adesiva complementar ao molde reduzido, sem que a eliminação de urina e fezes, bem como os cuidados maternos tenham sido prejudicados (Silva et al., 2016).



TRATAMENTO COM CREATINA

A suplementação com creatina para os transtornos neurológicos, como o mal de Parkinson, geralmente supera os 20 g/dia (Rosas et al., 2014). Após o nascimento dos filhotes, foram utilizadas ninhadas com 4 animais, sendo machos com peso entre 6-8 gramas no primeiro dia pós-natal (DPN). Os filhotes (fêmeas) só foram utilizadas para ajustar o número ideal de filhotes nas ninhadas. Os filhotes foram alocados de duas formas aleatórias conforme o tratamento com creatina e treinamento resistido:

A) durante os primeiros 28 dias de vida pós natal: 1- Tratados com creatina via gavagem (300mg/kg/dia) acordo com Murai et al. (2014); 2- Água destilada via gavagem (Murai et al., 2014). B) após os primeiros 28 dias de vida: 1- Tratados com creatina na água *ad libitum* (4.45 g/L) de acordo com Schuenke et al. (2011) e exercício físico; 2- Água. O consumo da solução com creatina foi mensurado diariamente. Schuenke et al. (2011) demonstraram que o consumo de creatina diário na água foi suficiente para atingir, no mínimo, 300mg/kg/dia. A quantidade de creatina a ser aplicada por dia via gavagem levou em consideração sua solubilidade de 18 mg/mL, como descrito por Gufford et al. (2010).

TRATAMENTO COM EXERCÍCIO DE RESISTÊNCIA

O modelo a ser usado para o treinamento foi adaptado de Antônio-Santos et al. (2016). Neste modelo os ratos subiram uma escada no período pós-natal com

uma sobrecarga progressiva fixada nas suas caudas. Antes do programa de treinamento ser iniciado, para que o animal reconheça a escada, ele passou por um período de adaptação, entre o 29º e 33º dia de vida pós-natal. No dia 29, o animal reconheceu o aparato a partir da caixa inferior, sendo colocado por 30 segundos para a exploração do ambiente. No dia 30 o animal foi colocado a partir do ponto “1” e subiu 10 vezes até o topo, no dia 31 ele foi colocado no ponto 2 e subiu 10 vezes até o topo. No dia 32 o animal subiu apenas com o gancho na cauda a partir do ponto “1” e no dia 33 subiu com todo o aparato, 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 deverá realizar o treinamento em cada semana. Neste teste de sobrecarga máxima, calculou-se 75% do peso do animal, que foi usado na primeira subida do teste. A partir da segunda subida foram acrescentados 10 g cada vez que o animal conseguiu subir, com o intervalo de descanso entre elas de 120 segundos. A última carga com a qual ele conseguiu subir, após 3 falhas consecutivas, foi considerada a sobrecarga máxima a ser usada no treinamento durante a semana seguinte. Cada subida contou com o tempo máximo de 60 segundos. Após a definição da carga máxima, as sessões foram realizadas com 30%, 50% e 80% da carga máxima do animal. A primeira subida foi realizada com 30%, a segunda subida com 50% e da terceira até a décima subida com 80% da sobrecarga máxima individual. O tempo máximo entre as subidas foi de 40 segundos. O tempo de descanso entre subidas durante o programa de treinamento foi de 90 segundos. Este programa de treino de resistência tem como plano 10 subidas por dia, 5 dias/semana, durante 4 semanas, com carga gradualmente acrescida. A escada utilizada foi adaptada do modelo de António- Santos et al. (2016) e teve seus degraus divididos em 3 partes, onde o início foi na parte 1 e o final na parte 3.

GRUPOS EXPERIMENTAIS

Ao final, os filhotes compõem os seguintes grupos: 1) Controle água não treinado (C-A-NT, n=11); 2) Controle água treinado (C-A-T, n=11); 3) Controle creatina não treinado (C-CR-NT, n=11); 4) Controle creatina treinado (C-CR-T, n=11); 5) Paralisia cerebral água não treinado (PC-A-NT, n=11); 6) Paralisia cerebral

água treinado (PC-A-T, n=11); 7) Paralisia cerebral creatina não treinado (PC-CR-NT, n=11); 8) Paralisia cerebral creatina treinado (PC-CR-T, n=11). Os filhotes foram identificados através de marcações feitas com violeta de genciana e o desmame ocorreu no 25º dia de vida.

ANÁLISES EXPERIMENTAIS

Caracterização somática

O peso corporal das gestantes e lactantes foi avaliado semanalmente. Ao nascimento foram registrados o peso geral da ninhada, o número de filhotes e dias de gestação. O peso corporal dos filhotes foi registrado ao nascimento, no 8º, 14º, e 21º ao 62º dia de vida.

6.1.2. Consumo alimentar e hídrico

O consumo alimentar foi avaliado diariamente 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). Para evitar que os animais defecassem ou urinassem na ração caso elas fossem colocadas dentro da gaiola, os pellets foram pesados e colocados na própria tampa da gaiola. De forma semelhante, o consumo hídrico foi realizado pesando a própria garrafa com água (pesagem manual da garrafa antes e depois de um período de consumo - 24h) (ALI; KRAVITZ, 2018).

Análise da força muscular

O teste de força da preensão dos membros anteriores foi realizado através de um aparelho digital (Animal GripStrength System - SD instruments) antes e após o treinamento resistido (P30 e P60). 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.

Análise da marcha em CatWalk

Antes e após o treinamento foi avaliada a marcha (P30 e P60). A análise da locomoção foi realizada pelo método descrito por Herold et al. (2016) utilizando o sistema de análise de locomoção (Gaitanalysis 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 estáticos e dinâmicos. Os parâmetros estáticos avaliados foram: duração do passo, da fase de estação e da fase de oscilação da marcha. Os parâmetros dinâmicos avaliados foram: mensuração da coordenação espaço temporal entre os membros, padrões de passo entre as patas e a magnitude da pressão das pegadas. Este método foi escolhido em virtude do mesmo ser uma ferramenta eficiente em quantificar déficits na locomoção.

Coleta do nervo periférico e processamento histológico

Após a coleta no dia 61, os animais de cada grupo foram anestesiados com uma associação de cloridrato de ketamina (60 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg) por via subcutânea e perfundidos por via transcardíaca com uma solução salina tamponada (PBS) 0,05 M em pH 7,3, seguida por uma mistura fixadora de paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 1%, diluídos em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,3. Foi estabelecida uma relação de 1 mL/g de peso corpóreo para determinação das quantidades de soluções empregadas na perfusão de cada animal. Após a perfusão, com o auxílio de uma lupa, o nervo isquiático direito de cada animal foi cuidadosamente dissecado. Os nervos foram imersos na mesma solução fixadora. Posteriormente, os nervos foram refixados em tetróxido de ósmio a 1%, diluídos em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3, durante duas horas, a 4 °C. Os tecidos osmicados foram desidratados em séries crescentes de acetona e incluídos em araldite®, de modo a posicionar o nervo alinhado em relação ao bloco de araldite® para assegurar secções transversais de suas fibras. Com um ultramicrotomo (Dupont Sorval modelo Porter Blum MT-2B®), utilizando navalha de vidro, cortes transversais semi-finos de 0,5 mm de espessura serão obtidos das amostras incluídas e, em seguida, esses cortes serão montados em lâminas coradas com azul de toluidina a 1% para a análise morfológica e morfométrica da secção transversal do nervo isquiático



Avaliação do nervo ciático em microscopia de luz

Com um microscópio de luz BR044 (Carl Zeiss) com objetivas de 10X, 20X 40X e 100X, a análise morfológica realizará a avaliação de fibras mielinizadas e não-mielinizadas, espaço intersticial, além do tecido conjuntivo endoneural, a fim de detectar qualquer sinal de dano estrutural e padrões anormais de mielinização no nervo isquiático, bem como possíveis efeitos do treinamento de resistência sobre a estrutura nervosa. As medidas de área e diâmetro mínimo das secções transversais do nervo isquiático de todos os animais serão realizadas através do mesmo microscópio de luz BR044 (Carl Zeiss) com objetiva de 20X.

Aferição do peso e comprimento da tibia

Após a dissecação, a tibia direita foi imediatamente pesada na balança de pesagem hidrostática, em um equilíbrio de precisão (0,01 g). O comprimento total dos ossos foram aferidos utilizando um parquímetro digital (Jomarca ®) com uma precisão de 0,01 mm. Sobre superfície lisa com sua face ventral voltada para cima. Esta análise foi realizada no dia 62.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram primeiramente analisados quanto à distribuição normal (teste de Kolmogorov-Smirnov). Para avaliar diferenças significantes no consumo de creatina e nos dados antes do treinamento (peso corporal, consumo alimentar, catwalk e força muscular) foram empregados os testes Two-Way ANOVA medidas repetidas e múltiplas comparações seguido do teste post hoc de

Tukey. Para as comparações após o treinamento resistido (peso corporal, catwalk e força muscular), o teste Three-Way múltiplas comparações seguidas do teste post hoc de Tukey foi aplicado. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão, sendo o nível de significância utilizado de 5% ($p < 0,05$). Foi utilizado o software GraphPad Prism (versão 8.4.3) para análises dos dados.

6. RESULTADOS

Durante todo o período experimental, não foram encontradas diferenças significativas com relação ao consumo de creatina na água *ad libitum* entre os grupos controle e PC, treinados ou não, no P30, 40 [F(1,28)=3.208; p:n.s.], 50 [F(1,28) = 3.440; p:n.s.], e 60 [F (1,28) = 0.002; p:n.s.] (Tukey *posthoc* test: p: n.s.; Tabela 1). Avaliando o efeito precoce do modelo de paralisia cerebral sobre o peso corporal foi possível observar redução de peso significativa no P8 e P14 [F(1,86) =78.66; p<0.0001] (Sidak *posthoc* test: p<0.0001; Figura 1A). A partir do início da suplementação com creatina, o peso corporal de ambos os grupos controle aumentou de forma gradual com diferenças significantes entre os animais que receberam água comparado aos que receberam creatina nos dias 21, 22, 23, 28, 29 e 30 (Tukey *posthoc* test: p<0.05; Figura 1B). Os animais de ambos os grupos PC comparado aos dois grupos controles apresentaram redução do peso corporal do dia 21 ao dia 30 (Tukey *posthoc* test: p<0.05; Figura 1B). Além disso, o peso corporal foi maior nos animais PC que receberam creatina nos dias 23, 24, 25, 26, 28, 29 e 30 (Tukey *posthoc* test: p<0.05; Figura 1B). Durante e após o treinamento resistido, os animais PC apresentaram redução do peso quando comparado aos animais controle no P40 [F(1,80)=207.9; p<0.0001], 50 [F(1,80) = 127.7; p<0.0001] e 60 [F(1,80) = 60.27; p<0.0001] (Tukey *posthoc* test: p<0.05; Figura 2). A suplementação de creatina ocasionou aumento do peso corporal nos animais controle não treinados no P40 [F(1,80) = 18.85; p<0.0001] (Tukey *posthoc* test: p<0.05; Figura 2). Não houve efeito do treinamento resistido no peso corporal (Tukey *posthoc* test: p: n.s.; Figura 2).

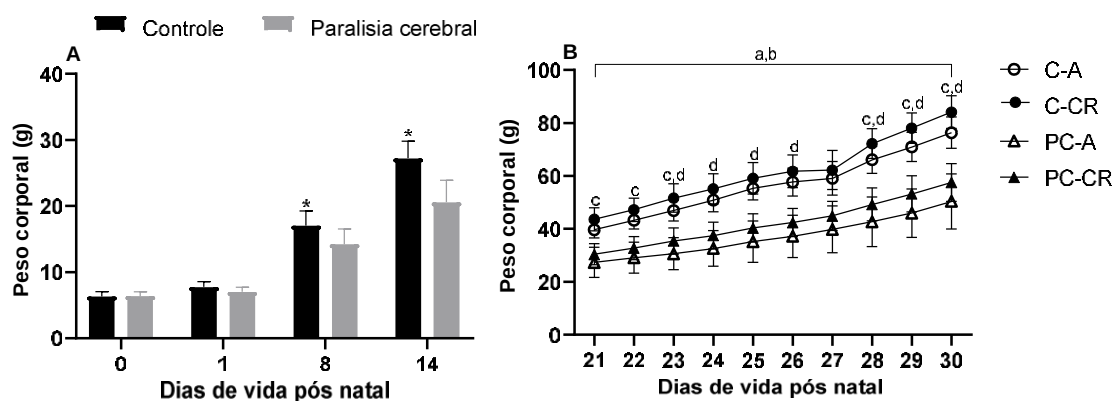
Tabela 1. Consumo de creatina na água nos diferentes grupos.

Dia de vida__	Grupos experimentais			
	C-CR-NT	C-CR-T	PC-CR-NT	PC-CR-T
P30	0,44 ± 0,05	-	0,50 ± 0,12	-
P40	0,43 ± 0,06	0,38 ± 0,03	0,44 ± 0,07	0,47 ± 0,11
P50	0,38 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,36 ± 0,06	0,30 ± 0,08
P60	0,36 ± 0,05	0,34 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,40 ± 0,12
Média geral	0,40 ± 0,05	0,36 ± 0,04	0,40 ± 0,07	0,39 ± 0,10

Fonte: Isla Ariadny (2021)

Valores representam média ± desvio padrão. Controle Creatina Não Treinado (C-CR-NT, n=8), Controle Creatina Treinado (C-CR-T, n=8), PC Creatina Não Treinado (PC-CR-NT, n=8), PC Creatina Treinado (PC-CR-T, n=8). Teste T não pareado e Two-way ANOVA múltiplas comparações seguido do teste *post hoc* de Tukey.

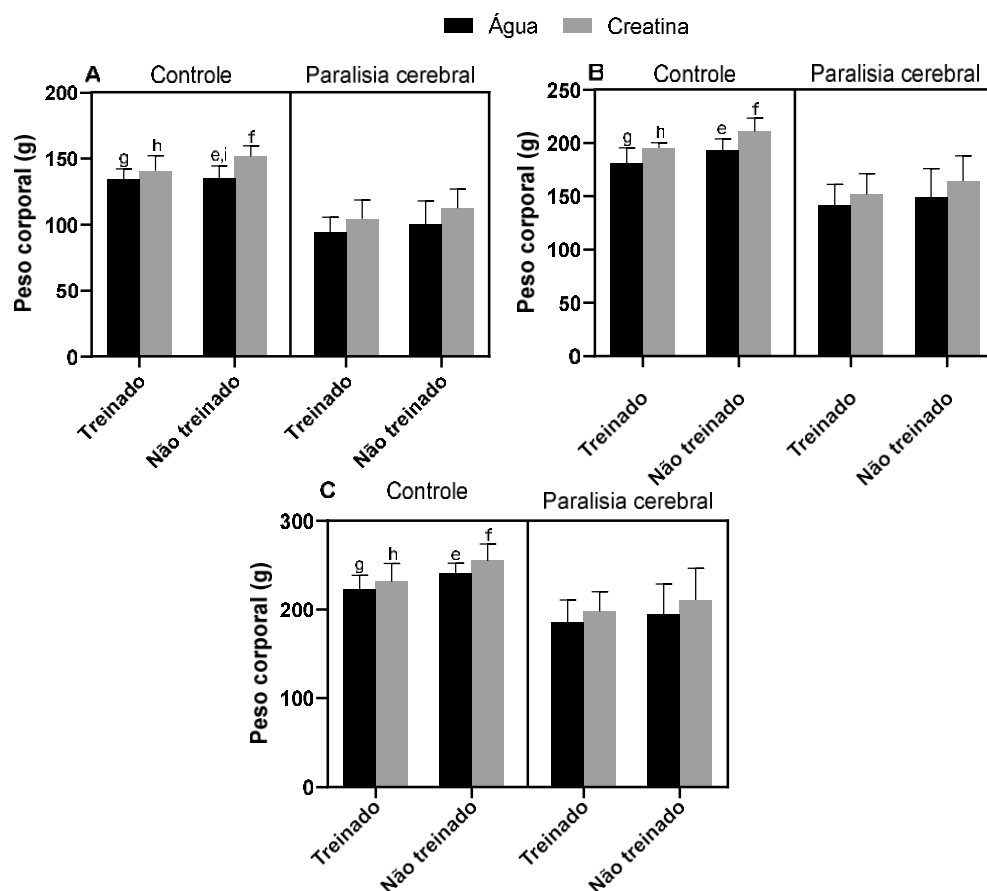
Figura 1. Efeitos da Paralisia Cerebral e da Creatina no peso corporal no período pós-natal antes do treinamento.



Fonte: Isla Ariadny2021.

(A) Peso corporal dos animais Controle (n=44) e Paralisia Cerebral (n=44). (B) Peso corporal dos animais dos grupos Controle Água (C-A, n=22), Controle Creatina (C-CR, n=22), Paralisia Cerebral Água (PC-A, n=22) e Paralisia Cerebral Creatina (PC-CR, n=22) nos dias 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30 de vida pós-natal. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Two-Way ANOVA medidas repetidas e múltiplas comparações seguido do teste *post hoc* de Tukey. C vs PC: * $p < 0.05$; C-A vs PC-A: ^a $p < 0.05$; C-CR vs PC-CR: ^b $p < 0.05$; C-A vs C-CR: ^c $p < 0.05$; PC-A vs PC-CR: ^d $p < 0.05$.

Figura 2. Efeitos da Paralisia Cerebral e da Creatina no peso corporal no período pós-natal após do treinamento.



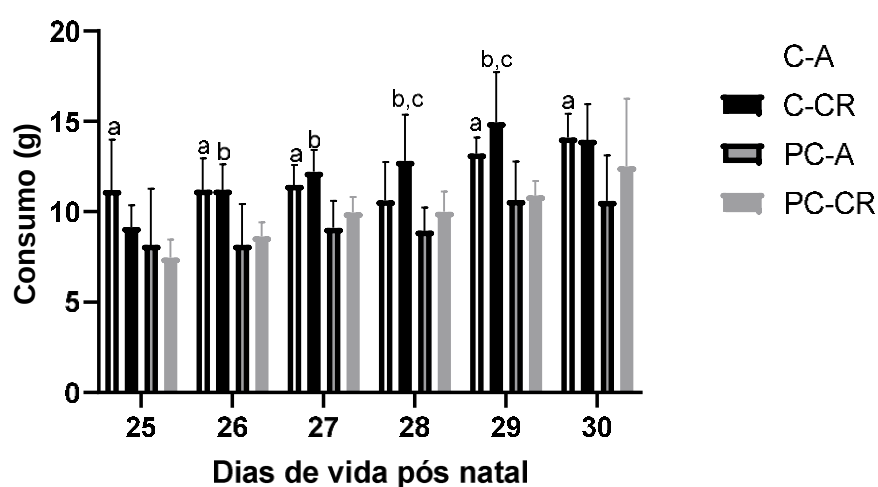
Fonte: Isla Ariadny (2021)

Peso corporal dos animais dos grupos Controle Água Não Treinado (C-A-NT, n=11), Controle Água Treinado (C-A-T, n=11), Controle Creatina Não Treinado (C-CR-NT, n=11), Controle Creatina Treinado (C-CR-T, n=11), PC Água Não Treinado (PC-A-NT, n=11), PC Água Treinado (PC-A-T, n=11), PC Creatina Não Treinado (PC-CR-NT, n=11) e PC Creatina Treinado (PC-CR-T, n=11) nos dias 40 (A), 50 (B) e 60 (C) de vida pós-natal. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Three- Way ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey. C-A-NT vs PC-A-NT: ^ep<0.05; C-CR-NT vs PC-CR-NT: ^fp<0.05; C-A-T vs PC-A-T; ^gp<0.05; C-CR-T vs PC-CR-T: ^hp<0.05.

Com relação ao consumo alimentar, encontramos redução significativa ocasionada pela PC no P25, 26, 27, 29 e 30 entre os animais que receberam água e no P26, 27, 28 e 29 entre os animais que receberam creatina, além de aumento do consumo nos animais controle que receberam creatina no P28 e 29 (Tukey

posthoc test: $p < 0.05$; Figura 3). Os animais PC também apresentaram redução do consumo no P40 [$F(1,56) = 8.939$; $p > 0.05$], 50 [$F(1,56) = 11.67$; $p < 0.05$] e 60 [$F(1,56) = 14.25$; $p < 0.001$] entre os animais que receberam água e não treinaram (Tukey *posthoc* test: $p < 0.05$; Figura 4). A suplementação com creatina ocasionou aumento do consumo nos animais controle não treinados no P50 [$F(1,56) = 1.159$; $p < 0.05$] e 60 [$F(1,56) = 0.253$; $p < 0.05$], já o treinamento resistido ocasionou redução no consumo nos animais controle que receberam água no P60 [$F(1,56) = 2.000$; $p < 0.05$] (Tukey *posthoc* test: $p < 0.05$; Figura 4).

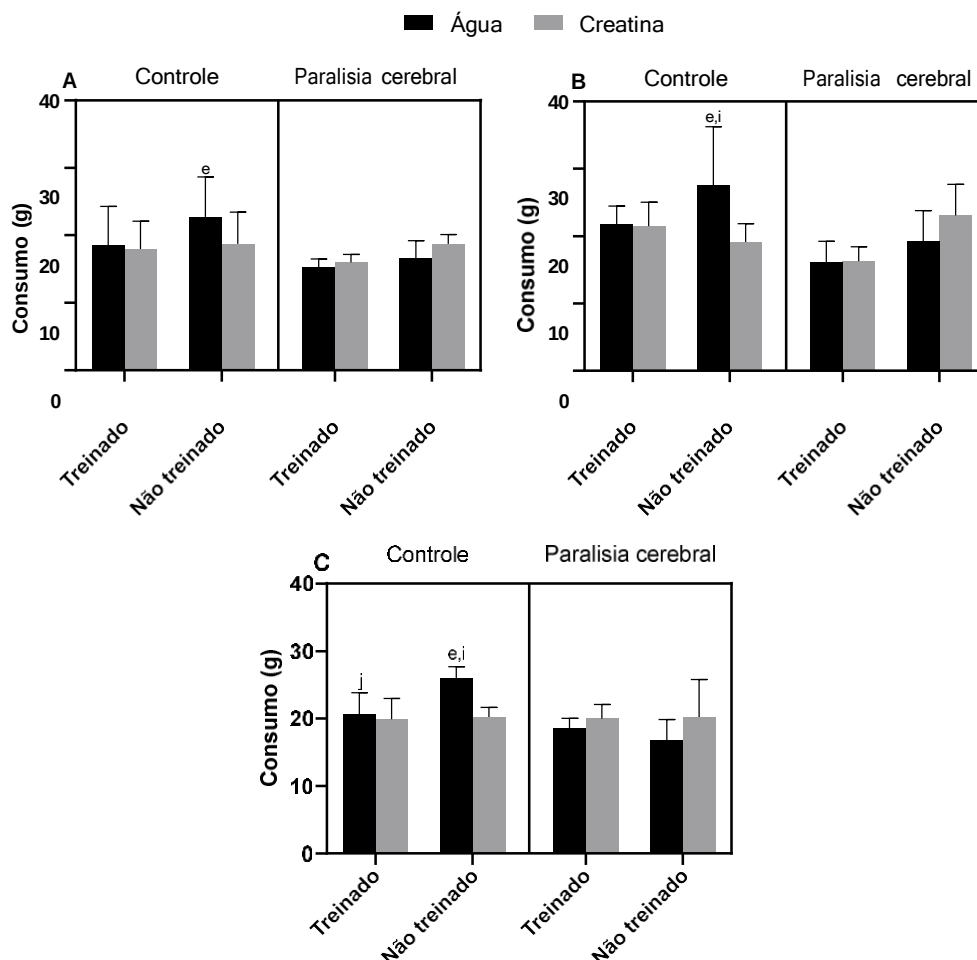
Figura 3. Efeitos da Paralisia Cerebral e da Creatina no consumo alimentar no período pós-natal antes do treinamento.



Fonte: Isla Ariadny (2021)

Consumo alimentar dos animais dos grupos Controle Água (C-A, $n=16$), Controle Creatina (C-CR, $n=16$), Paralisia Cerebral Água (PC-A, $n=16$) e Paralisia Cerebral Creatina (PC-CR, $n=16$) nos dias 25, 26, 27, 28, 29 e 30 de vida pós-natal. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Two-Way ANOVA múltiplas comparações seguido do teste *post hoc* de Tukey. C-A vs PC-A: ^a $p < 0.05$; C-CR vs PC-CR: ^b $p < 0.05$; C-A vs C-CR: ^c $p < 0.05$.

Figura 4. Efeitos da Paralisia Cerebral e da Creatina no consumo alimentar no período pós-natal após do treinamento.



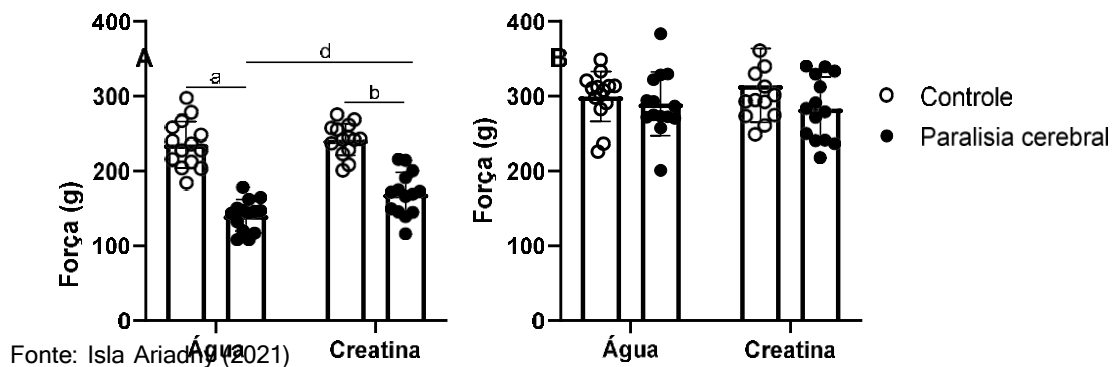
Fonte: Isla Ariadny (2021)

Consumo alimentar dos animais dos grupos Controle Água Não Treinado (C-A-NT, n=8), Controle Água Treinado (C-A-T, n=8), Controle Creatina Não Treinado (C-CR-NT, n=8), Controle Creatina Treinado (C-CR-T, n=8), PC Água Não Treinado (PC-A-NT, n=8), PC Água Treinado (PC-A-T, n=8), PC Creatina Não Treinado (PC-CR-NT, n=8) e PC Creatina Treinado (PC-CR-T, n=8) nos dias 40 (A), 50 (B) e 60 (C) de vida pós-natal. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Three-Way ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey. C-A-NT vs PC-A-NT: ^ep<0.05; C-A-NT vs C-CR-NT: ⁱp<0.05.

No que se refere a força máxima dos animais avaliada pelo teste de GripStrength antes do treinamento, os animais de ambos os grupos PC apresentaram redução da força em comparação aos animais do grupo controle [$F(1,52) = 145.4$; $p < 0.0001$], e a suplementação com creatina ocasionou aumento da força nos animais PC [$F(1,52) = 6.700$; $p < 0.05$](Tukey *posthoc* test: $p < 0.05$; Figura

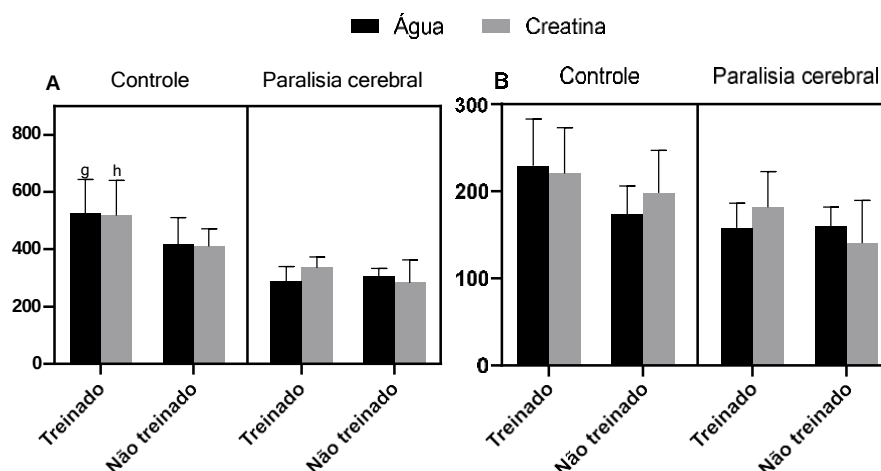
5A). Por outro lado, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos ao avaliar os dados relativos ao peso corporal (Tukey *post hoc* test: p : n.s.; Figura 5B). Semelhantemente, após o treinamento resistido, diferenças significantes foram encontradas entre os animais PC e controle treinados que receberam creatina ou água quando avaliados os dados brutos [$F(1,48) = 57.14$; $p < 0.0001$] (Tukey *post hoc* test: $p < 0.05$; Figura 6A), mas não o relativo (Tukey *post hoc* test: $p < 0.05$; Figura 6B).

Figura 5. Efeitos da Paralisia Cerebral e da Creatina na força máxima avaliada por GripStrength no período pós-natal antes do treinamento.



Força bruta (A) e relativa (B) dos animais dos grupos Controle Água (C-A, $n=14$), Controle Creatina (C-CR, $n=14$), Paralisia Cerebral Água (PC-A, $n=14$) e Paralisia Cerebral Creatina (PC-CR, $n=14$). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Two-way ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey. C-A vs PC-A: ^a $p < 0.05$; C-CR vs PC-CR: ^b $p < 0.05$; PC-A vs PC-CR: ^d $p < 0.05$.

Figura 6. Efeitos da Paralisia Cerebral e da Creatina na força avaliada por GripStrength no período pós-natal após o treinamento.



Fonte: Isla Ariadny (2021)

Força bruta (A) e relativa (B) dos animais dos grupos Controle Água Não Treinado (C-A-NT, n=7), Controle Água Treinado (C-A-T, n=7), Controle Creatina Não Treinado (C-CR-NT, n=7), Controle Creatina Treinado (C-CR-T, n=7), PC Água Não Treinado (PC-A-NT, n=7), PC Água Treinado (PC-A-T, n=7), PC Creatina Não Treinado (PC-CR-NT, n=7) e PC Creatina Treinado (PC-CR-T, n=7). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Three-Way ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey. C-A-T vs PC-A-T; ^gp<0.05; C-CR-T vs PC-CR-T: ^hp<0.05.

Os dados do treinamento resistido foram avaliados para um melhor entendimento dos efeitos da PC e da creatina na força dos animais. Com relação aos dados brutos, quando comparado ao controle nas semanas 0 (sobrecarga), 1, 2, 3 e 4, os animais PC que receberam água ou creatina apresentaram redução significativa da carga utilizada quando comparado aos controles (Tukey *post hoc* test: $p < 0.05$; Tabela 2). Porém, ao analisar os dados de carga relativos ao peso corporal não foram encontradas diferenças entre os grupos. Além disso, foi observada uma redução significativa no tempo de subida nos animais PC que receberam água na semana 2 e creatina nas semanas 0 e 2 em comparação aos respectivos controles (Tukey *post hoc* test: $p < 0.05$; Tabela 2).

Tabela 2. Efeitos da Paralisia Cerebral e da Creatina na progressão de cargas e no tempo de subida durante as 4 semanas de treinamento resistido na escada.

	Grupos experimentais							
	C-A-T		C-CR-T		PC-A-T		PC-CR-T	
	Carga (g)	Tempo (s)	Carga (g)	Tempo (s)	Carga (g)	Tempo (s)	Carga (g)	Tempo (s)
Dados brutos								
Sobrecarga	289,8 ± 43,0 ^g	8,0 ± 2,9	310,4 ± 33,2 ^h	6,5 ± 1,3 ^h	217,9 ± 39,8	10,2 ± 4,3	230,0 ± 30,0	10,4 ± 1,7
Semana 1	179,1 ± 18,9 ^g	8,4 ± 2,5	195,6 ± 19,1 ^h	8,2 ± 2,9	125,2 ± 27,2	13,7 ± 9,0	133,6 ± 21,0	12,9 ± 3,1
Semana 2	292,3 ± 55,1 ^g	6,9 ± 2,0 ^g	315,6 ± 53,1 ^h	6,4 ± 1,3 ^h	208,6 ± 44,4	12,0 ± 4,8	206,6 ± 35,3	12,1 ± 6,1
Semana 3	391,0 ± 84,2 ^g	10,2 ± 7,9	421,5 ± 54,4 ^h	6,1 ± 0,8	291,8 ± 66,9	9,1 ± 4,2	329,2 ± 83,0	8,2 ± 1,5
Semana 4	470,6 ± 84,5 ^g	6,2 ± 2,4	500,6 ± 65,4 ^h	5,9 ± 1,1	370,8 ± 80,7	8,6 ± 3,0	399,5 ± 74,8	7,4 ± 1,0
Dados relativos								
Sobrecarga	199,4 ± 35,1	-	195,6 ± 22,6	-	192,2 ± 19,0	-	195,3 ± 45,9	-
Semana 1	161,6 ± 17,1	-	165,5 ± 16,1	-	162,5 ± 22,6	-	156,0 ± 15,1	-
Semana 2	206,8 ± 42,8	-	205,1 ± 36,8	-	190,6 ± 25,4	-	180,5 ± 40,1	-
Semana 3	231,2 ± 61,0	-	224,3 ± 30,5	-	206,2 ± 33,2	-	237,6 ± 88,1	-
Semana 4	244,7 ± 69,4	-	229,7 ± 30,6	-	213,7 ± 28,5	-	258,0 ± 104,7	-

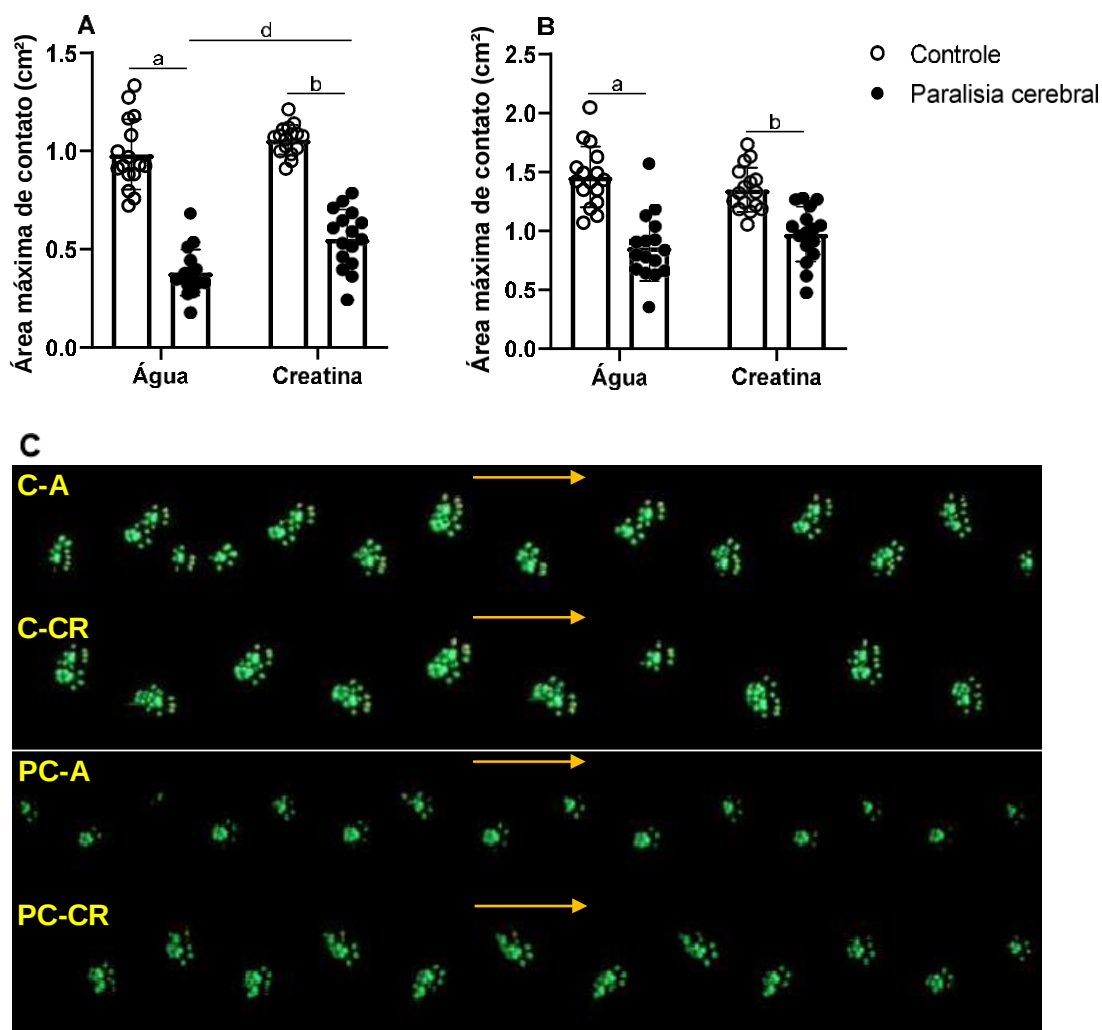
Fonte: Isla Ariadny (2021)

Valores representam média ± desvio padrão. Controle Água Treinado (C-A-T, n=11), Controle Creatina Treinado (C-CR-T, n=11), PC Água Treinado (PC-A-T, n=11), PC Creatina Treinado (PC-CR-T, n=11). Two-way ANOVA múltiplas comparações seguido do teste *post hoc* de Tukey. C-A-T vs PC-A-T; ^gp<0.05; C-CR-T vs PC-CR-T:

^hp<0.05.

Relacionado à análise da marcha por CatWalk antes do treinamento, quando comparados com o grupo controle, os animais de ambos os grupos PC apresentaram significativa redução da área máxima de contato com a plataforma tanto nos dados brutos [$F(1,60) = 269.1$; $p < 0.0001$] quanto nos dados relativos [$F(1,60) = 65.25$; $p < 0.0001$] ao peso corporal (Tukey *post hoc* test: $p < 0.05$; Figura 7A,B). A suplementação de creatina, por sua vez, aumentou a área de contato dos animais PC avaliando os dados brutos [$F(1,60) = 13.39$; $p < 0.001$] (Tukey *post hoc* test: $p < 0.05$; Figura 7A). Após o treinamento, diferenças significantes foram observadas entre os animais controle e PC que receberam água e foram treinados nos dados brutos [$F(1,56) = 34.70$; $p < 0.0001$] e relativos [$F(1,56) = 6.055$; $p < 0.05$] (Tukey *post hoc* test: $p < 0.05$; Figura 8A,B).

Figura 7. Efeitos da Paralisia Cerebral e da Creatina na área máxima de contato avaliada por CatWalk XT no período pós-natal antes do treinamento.

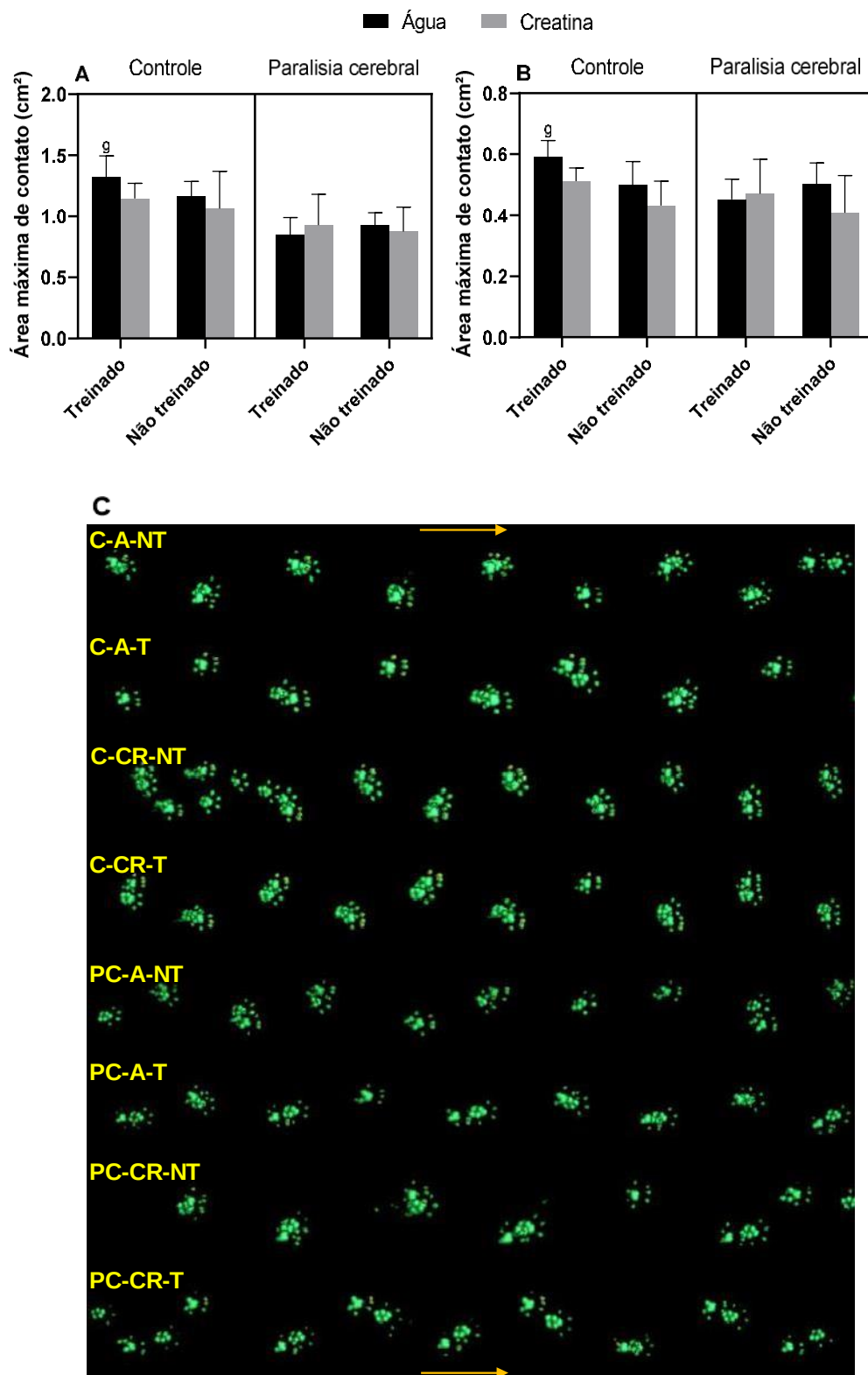


Fonte: Isla Ariadny (2021)

Dados brutos (A), dados relativos (B) e imagens representativas (C) dos animais dos grupos Controle Água (C-A, n=16), Controle Creatina (C-CR, n=16), Paralisia Cerebral Água (PC-A, n=16) e Paralisia Cerebral Creatina (PC-CR, n=16). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Two-way ANOVA múltiplas comparações seguido do teste *post hoc* de Tukey. C-A vs PC-A: ^ap<0.05; C-CR vs PC-CR:

^bp<0.05; PC-A vs PC-CR: ^dp<0.05.

Figura 8. Efeitos da Paralisia Cerebral e da Creatina na área máxima de contato avaliada por CatWalk XT no período pós-natal após o treinamento.



Fonte: Isla Ariadny (2021)

Dados brutos (A), dados relativos (B) e imagens representativas (C) dos animais dos grupos Controle Água Não Treinado (C-A-NT, n=8), Controle Água Treinado (C-A-T, n=8), Controle Creatina Não Treinado (C-CR-NT, n=8), Controle Creatina Treinado (C-CR-T, n=8), PC Água Não Treinado (PC-A-NT, n=8), PC Água Treinado (PC-A-T, n=8), PC Creatina Não Treinado (PC-CR-NT, n=8) e PC Creatina Treinado (PC-CR-T, n=8). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Three-Way ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey. C-A-T vs PC-A-T; $^a p < 0.05$.

Por fim, em relação ao peso da tíbia e ao peso do nervo ciático, não houve diferenças entre os grupos (Tukey *post hoc* test: p : n.s.; Tabela 3). Por outro lado, foi observada uma diferença significativa com relação ao comprimento da tíbia, entre os grupos PC e controle que receberam creatina e treinamento [$F(1,32) = 14.17$; $p < 0.001$] (Tukey *post hoc* test: $p < 0.05$; Tabela 3). Os dados parciais sobre o número e área das células no nervo ciático não indicaram diferenças significantes entre os grupos (Tukey *post hoc* test: p : n.s.; Figura 9A,B). A figura 10 apresenta imagens representativas de secções transversais do nervo ciático. Posteriormente, o número de animais será ampliado e assim serão realizadas as análises estatísticas e histológicas referentes ao número e área das células.

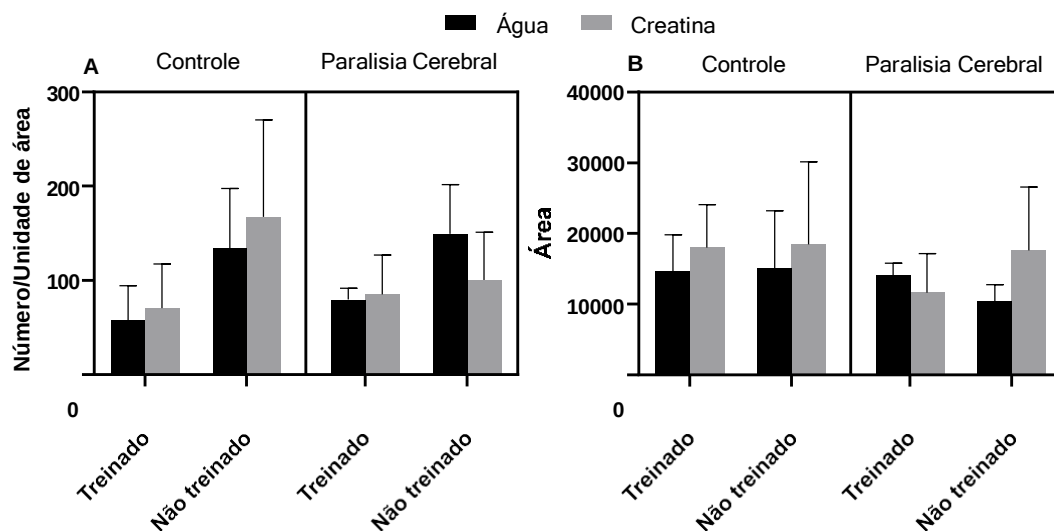
Tabela 3. Efeitos da Paralisia Cerebral e da Creatina no peso e comprimento de estruturas em animais treinados ou sedentários.

	Grupos experimentais							
	C-A-NT	C-A-T	C-CR-NT	C-CR-T	PC-A-NT	PC-A-T	PC-CR-NT	PC-CR-T
Peso da tíbia	0,44 $\pm$ 0,13	0,33 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,06	0,46 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,15	0,36 $\pm$ 0,10	0,35 $\pm$ 0,06	0,34 $\pm$ 0,09
Comprimento da tíbia	30,10 $\pm$ 3,23	29,68 $\pm$ 2,18	31,58 $\pm$ 1,30	31,51 $\pm$ 0,81 ^h	29,51 $\pm$ 0,99	28,42 $\pm$ 1,33	28,86 $\pm$ 1,27	26,27 $\pm$ 3,46
Peso do nervo ciático	0,08 $\pm$ 0,12	0,03 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01

Fonte: Isla Ariadny (2021)

Valores representam média $\pm$ desvio padrão. Controle Água Não Treinado (C-A-NT, n=5); Controle Água Treinado (C-A-T, n=5), Controle Creatina Não Treinado (C-CR-NT, n=5); Controle Creatina Treinado (C-CR-T, n=5), PC Água Não Treinado (PC-A-NT, n=5); PC Água Treinado (PC-A-T, n=5), PC Creatina Não Treinado (PC-CR-NT, n=5); PC Creatina Treinado (PC-CR-T, n=5). Three-way ANOVA medidas repetidas seguido do teste *post hoc* de Tukey. C-CR-T vs PC-CR-T: ^h $p < 0.05$.

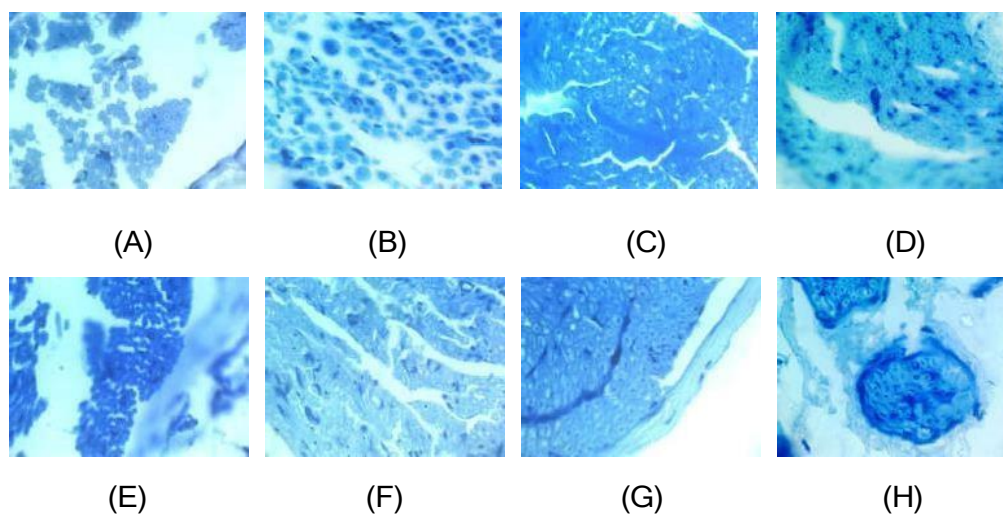
Figura 9. Efeitos da Paralisia Cerebral e da Creatina no número e área de células por campo avaliados do nervo ciático no período pós-natal após o treinamento.



Fonte: Isla Ariadny (2021)

Número de células (A) e área das células (B) dos animais dos grupos Controle Água Não Treinado (C-A-NT, n=3), Controle Água Treinado (C-A-T, n=2), Controle Creatina Não Treinado (C-CR-NT, n=2), Controle Creatina Treinado (C-CR-T, n=4), PC Água Não Treinado (PC-A-NT, n=2), PC Água Treinado (PC-A-T, n=2), PC Creatina Não Treinado (PC-CR-NT, n=4) e PC Creatina Treinado (PC-CR-T, n=4). Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. Three-Way ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey.

Figura 10. Secções transversais do nervo ciático em microscopia de luz com o aumento de 1000X. Neurônios por unidade de área.



Fonte: Isla Ariadny (2021)

Secções transversais do nervo ciático dos grupos (A) C-CR-T, (B) PC-CR-T, (C) C-A-NT, (D) C-A-T, (E) PC-CR-NT, (F) C-CR-NT, (G) C-A-T, (H) PC-A-T, corados com azul de toluidina a 1% e visualizados através do microscópio de luz com o aumento de 1000X.

Desta tese foi gerado um artigo de revisão sistemática que foi submetido e está em análise e os resultados obtidos acima serão organizados e preparados para envio para revista Clinical Rehabilitation.

Clinical Rehabilitation - Manuscript ID CRE-2021-11616 successfully submitted

De: Clinical Rehabilitation (onbehalf@manuscriptcentral.com)

Para: isla.ariadny@hotmail.com; raulmanhaesdecastro@gmail.com; luana8188@hotmail.com; henriquegouveia.93@hotmail.com; ewertoncellos@gmail.com; diegovisco@gmail.com; aeltoscano@yahoo.com.br

Data: segunda-feira, 23 de agosto de 2021 13:41 BRT

23-Aug-2021

Dear Ana Elisa Toscano,

Thank you for submitting your paper, "Effects of resistance training on the locomotion of individuals with spastic diplegia: a systematic review". to Clinical Rehabilitation. It will first be reviewed by the Editor in Chief. The Editor in chief will then decide on the next step.

The attached documents, "Editorial process after submission" and "Editorial process pathways", show the various decisions that may be made, and the possible pathways your paper may follow. We recommend that you download these documents and save them with your other files relating to this paper.

Please note that whenever you email the journal, you must use your paper's registration number, CRE-2021-11616. At present the email to use is clinical.rehabilitation@sagepub.co.uk but, once your paper has been assigned to an editor you should use the email given.

Yours,

Editor-in-Chief
Clinical Rehabilitation

Follow the journal, Clinical Rehabilitation on Twitter: @ClinicalRehab

7. DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliados os efeitos da PC experimental e das intervenções com creatina e treinamento resistido no peso corporal, no consumo alimentar, na força muscular máxima, na locomoção avaliada por catwalk, na capacidade de realizar o treinamento resistido, no peso e comprimento da tibia e na morfologia do nervo ciático. Nossos resultados demonstraram que a PC ocasionou: Redução do peso corporal e consumo alimentar em todo o período pós-natal, diminuição da força muscular e da carga máxima durante o treinamento, aumento do tempo necessário para realizar uma série no treinamento, prejuízos na locomoção evidenciado pela redução da área máxima de contato e redução no comprimento da tibia. Por outro lado, a suplementação de creatina, nos animais com PC ocasionou aumento do peso corporal, da força muscular e da área máxima de contato com a plataforma. Ainda, nos animais controle, a suplementação com creatina aumentou o peso corporal e consumo alimentar.

Podemos dizer que a paralisia cerebral experimental ocasionou, neste estudo, um quadro caracterizado por atraso no desenvolvimento somático associado às alterações motoras e fraqueza de membros posteriores. 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 ganho de peso pode estar relacionado ao dano motor produzido pela restrição sensório motora (RSM) durante o desenvolvimento. Estudos relataram que os ratos RSM desenvolveram déficits de locomoção e espasticidade dos músculos das pernas (DELCOUR et al., 2018b; STRATA et al., 2004). Além disso, a RSM pode ocasionar déficits nos movimentos de sucção e mastigação e diminuir a ingestão de alimentos, o que também foi visto em nosso estudo, antes e durante o treinamento resistido (LACERDA et al., 2017b). Entretanto, com relação ao consumo hídrico no presente estudo, os animais com PC não apresentaram redução da ingestão de água de forma significativa a partir do momento em que a creatina foi oferecida na água, o que consequentemente não prejudicou o consumo de creatina 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. 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 hiper reflexia muscular sugerindo espasticidade. Assim, os resultados relacionados ao quadro observado no nosso estudo podem ser explicados principalmente pela capacidade da RSM de induzir atrofia, problemas de locomoção e ósseos (DELCOUR et al., 2018b; SILVA et al., 2016). Em nosso estudo, isso foi confirmado pela redução significativa da força muscular (GripStrength e treinamento resistido), da área máxima de contato com a plataforma CatWalk, do comprimento da tíbia. Além disso, os resultados podem estar associados à possíveis déficits de sucção e mastigação associadas à redução na ingestão de alimentos (LACERDA et al., 2017b) e redução da massa muscular induzida por desuso (COQ et al., 2008; DELCOUR et al., 2018a).

Com relação a suplementação de creatina nos animais PC, observamos aumento do peso corporal, da força muscular e da área máxima de contato. Aoki et al. (2004) relataram que a suplementação de creatina atenuou a perda muscular induzida por imobilização após suplementação contínua por 14 dias (5g/kg/dia) (AOKI et al., 2004). Após 14 dias de carga de creatina, o conteúdo total de creatina nos músculos sóleo e gastrocnêmico 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 creatina 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). Corroborando com a última observação, 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. Além disso, a suplementação não foi capaz de atenuar a redução da CSA e

diminuição da força muscular induzida por imobilização (MARZUCA-NASSR et al., 2019).

Assim, os efeitos da creatina parecem estar diretamente relacionados ao período de suplementação. É importante destacar que os pesquisadores vêm testando diferentes protocolos de suplementação para diversas condições. A dose utilizada pelo nosso estudo (300mg/kg/dia), diferente da dose utilizada pelos 2 estudos citados anteriormente (AOKI et al., 2004; MARZUCA-NASSR et al., 2019) é o equivalente a aproximadamente 21 g/dia para um indivíduo de 70 kg (MURAI et al., 2015). Utilizando doses semelhantes, estudos encontraram, por exemplo, aumento da massa óssea trabecular em ratas ovariectomizadas (DE SOUZA et al., 2012), atenuação da perda de massa muscular induzida por corticosteroides em ratos (MENEZES et al., 2007) e aumento da resposta tardia do estado anabólico da célula envolvendo o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) em humanos (DELDICQUE et al., 2005). Com relação ao consumo alimentar, observamos aumento do consumo associado à creatina antes e durante o exercício resistido. Apesar de não estar claro os mecanismos subjacentes, um estudo em modelos animal relatou que a concentração de creatina no cérebro desempenha um papel na regulação da ingestão de alimentos e peso corporal (GAILBRAITH; FURUKAWA, LI, 2006). Assim, a suplementação pode ter evitado uma redução do consumo ainda maior nos animais PC do que o observado neste estudo.

Sobre os efeitos do treinamento resistido, não houve diferenças nos dados avaliados nos animais PC. Entretanto, 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). Avaliações mais específicas, como por exemplo a expressão de proteínas de síntese e degradação proteica e morfologia das fibras musculares poderão avaliar melhor os efeitos ocasionados pelo treinamento de resistência nos animais do presente estudo. 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).

8. CONCLUSÃO

Os dados obtidos demonstraram que parâmetros do desenvolvimento somático, da força muscular, do consumo alimentar, do desenvolvimento ósseo e da locomoção da prole foram prejudicados pela paralisia cerebral. Não houveram diferenças significantes associadas ao treinamento resistido, o que torna necessário realizar avaliações mais específicas, como a expressão de proteínas de síntese e degradação protéica e morfologia das fibras musculares. No entanto, a suplementação com creatina foi capaz de atenuar os prejuízos no desenvolvimento somático, na força muscular e na locomoção ocasionados pela paralisia cerebral. Além disso, nos animais controle, a suplementação com creatina aumentou o peso corporal e consumo alimentar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

ANTOLIC A, ROY BD, TARNOPOLSKY MA, ZERNICKE RF, WOHL GR, SHAUGHNESSY SG, BOURGEOIS JM. **Creatine monohydrate increases bone mineral density in young Sprague-Dawley rats**. *Med Sci Sports Exerc*. 2007 May;39(5):816-20. doi: 10.1249/mss.0b013e318031fac4. PMID: 17468579.

ANTONIO-SANTOS, J. Daily resistance physical training alters the proportion of skeletal muscle fibers but not brain neurotrophic factors in young rats. *J Res. Cond.* v. 30, n.1, p. 3531-3538, 2016.

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. et al. Control of skeletal muscle atrophy in response to disuse: clinical/preclinical contentions and fallacies of evidence. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 311, n. 3, p. E594-604, 2016.

BALLARD, T. P.; MELBY, C. L.; CAMUS, H. et al. Effect of resistance exercise, with or without carbohydrate supplementation, on plasma ghrelin concentrations and postexercise hunger and food intake. **Metabolism**, v. 58, n. 8, p. 1191-9, 2009.

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.

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.

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

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.

BISCHOF F, BASU D, PETTIFOR JM. Pathological long-bone fractures in residents with cerebral palsy in a long-term care facility in South Africa. *Dev Med Child Neurol*. 2002 Feb;44(2):119-22. doi: 10.1017/s0012162201001773. PMID: 11848108.

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.; BATTERHAM, R. L.; KING, J. A.; STENSEL, D. J. 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, 2009.

CANS, C. et al. Recommendations from the SCPE collaborative group for defining and classifying cerebral palsy. *Developmental Medicine and Child Neurology*, [S.l.], v. 49, p. 35-38, Feb. 2007

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

- FARSHIDFAR, F.; PINDER, M. A.; MYRIE, S. B. Creatine Supplementation and Skeletal Muscle Metabolism for Building Muscle Mass- Review of the Potential Mechanisms of Action. *Curr Protein Pept Sci.* v. 18, n. 12, p. 1273-1287, 2017.
- 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.
- FERRAZ-PEREIRA, K. N. et al. Neonatal low-protein diet reduces the masticatory efficiency in rats. *Br J Nutr*, v. 114, n. 9, p. 1515-30, 2015.
- G. S. LOHIYA, F. M. CRINELLA, L. TAN-FIGUEROA, S. CAIRES, AND S. LOHIYA, **"Fracture epidemiology and control in a developmental center," Western Journal of Medicine**, vol. 170, no. 4, pp. 203-209, 1999.
- 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.
- GARLAND JR, T.; KELLY, S. A. Phenotypic plasticity and experimental evolution. *J. Exp. Biol*, v. 209, p. 2344-2361, 2006.
- 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.
- GEORGIEFF, M. K. Nutrition and the developing brain: Nutrient priorities and measurement. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 2, p. 614-620, 2007.
- GERBER I, AP GWYNN I, ALINI M, WALLIMANN T. **Stimulatory effects of creatine on metabolic activity, differentiation and mineralization of primary osteoblast- like cells in monolayer and micromass cell cultures.** *Eur Cell Mater.* 2005 Jul 15;10:8-22. doi: 10.22203/ecm.v010a02. PMID: 16025431.
- GLUCKMAN, P. D., M. A. HANSON, AND A. S. BEEDLE. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol*, v. 19, p. 1-19, 2007.
- GUFFORD BT, SRIRAGHAVAN K, MILLER NJ, MILLER DW, GU X, VENNERSTROM JL, ROBINSON DH. Physicochemical characterization of creatine N-methylguanidinium salts. *J Diet Suppl.* 2010 Sep;7(3):240-52. doi: 10.3109/19390211.2010.491507. PMID: 22432515. Ali; Kravitz, 2018
- HALES, C. N. et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *British Medical Journal*, v. 303, n. 6809, p. 1019-22, 1991.
- HOULIHAN CM, Stevenson RD. Bone density in cerebral palsy. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 2009 Aug;20(3):493-508. doi: 10.1016/j.pmr.2009.04.004. PMID: 19643349; PMCID: PMC2836770.
- HULTMAN, E. et al. Muscle creatine loading in men. **Journal of Applied Physiology**, v. 81, n. 1, p. 232-237, 1996.

IWAMOTO J. Effects of physical activity on bone: what type of physical activity and how much is optimal for bone health? *J Osteopor Phys Act.* v. 1, p. 101, 2013.

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.

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

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.

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

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

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.

MARQUES, A. H. et al. The influence of maternal prenatal and early childhood nutrition and maternal prenatal stress on offspring immune system development and neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Neuroscience*, v. 7, n. 7 JUL, p. 1-17, 2013.

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. Creatine and cyclocreatine attenuate MPTP neurotoxicity. *Experimental Neurology*, v. 157, n. 1, p. 142-1409, 1999.

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.

MENEZES, L. G. et al. Creatine supplementation attenuates corticosteroid-induced muscle wasting and impairment of exercise performance in rats. *Journal of Applied Physiology*, v. 102, n. 2, p. 698-703, 2007.

MIRSKY, R.; JESSEN, K. R. Embryonic and early postnatal development of Schwann cells. In: JESSEN, K. R.; RICHARDSON, W. D. *Glial cell development*. 2. ed. Oxford: New York, 2001. cap. 1, p. 1-20.

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.

MOREIRA, L. D. F. et al. Physical exercise and osteoporosis: effects of different types of exercises on bone and physical function of postmenopausal women. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v.58, n. 5, p. 514-22, 2014.

MORRIS C. Definition and classification of cerebral palsy: a historical perspective. *Dev Med Child Neurol Suppl.* 2007 Feb;109:3-7. doi: 10.1111/j.1469- 8749.2007.tb12609.x. PMID: 17370476

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.
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.

O'SHEA, T. M. Diagnosis, treatment, and prevention of cerebral palsy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, Philadelphia, PA, v. 51, n. 4, p. 816-828, Dec. 2008.

OROZCO-SOLÍS, R. et al. Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. **International Journal of Obesity**, v. 35, n. 7, p. 990-1000, 2011.

ORTIZ-HIDALGO, C.; WELLER, R. O. Peripheral Nervous System. In: STERNBERG, S. S. *Histology for Pathologists*. Philadelphia: Lippincott, cap. 12, p. 285- 311, 1997.

OSKOUI, M. et al. An update on the prevalence of cerebral palsy: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol*, v. 55, n. 6, p. 509-519, 2013.

PATO, T. R., SOUZA, D. R., LEITE, H. P. Epidemiologia da paralisia cerebral. *Acta Fisiátrica*, v.9, n. 2, p. 71-76, 2002.

PEREIRA HV. Paralisia cerebral. *ResidPediatri.* 2018;8(0 supl.1):49-55 DOI: 10.25060/residpediatric-2018.v8s1-09.

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

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.

PIGLIUCCI, M.; MURREN, C. J.; SCHLICHTING, C. D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2362-2367, 2006.

PIOVESANA, A. M. S. G. Encefalopatia crônica, paralisia cerebral. In: FONSECA, L. F.; PIANETTI, G.; XAVIER, C. C. *Compêndio de neurologia infantil*. São Paulo: Medsi, 2002.

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.

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.

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.

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.

SANTOS, A.F. Paralisia Cerebral: Uma revisão de literatura. *Revista Unimontes Científica*, 16(2), 2014.

SCHEINBERG, Morton Aaron et al. Saúde óssea na paralisia cerebral e introdução de uma nova terapia. *Einstein (São Paulo)* [online]. 2015, vol.13, n.4 [citado em 2021- 03-24], pp.555-559.

SCHUENKE, M. D.; BROOKS, N. E.; HIKIDA, R. S. Interactions of Aging, Overload, and Creatine Supplementation in Rat Plantaris Muscle. *J Aging Res*. 393416, 2011.

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.

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.

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.

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

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

TURNER CH , ROBLING AG. Exercícios para melhorar a resistência óssea. *British Journal of Sports Medicine* 2005; **39**: 188-189.

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.

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.

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.

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.

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation and phylogeny. **Proc Natl Acad Sci**, v. 83, n. 5, p. 1388-92, 1986.

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.

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

Clinical Rehabilitation

Effects of resistance training on the locomotion of individuals with spastic diplegia: a systematic review

Journal:	<i>Clinical Rehabilitation</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Paz, Isla ; Federal University of Pernambuco, Postgraduate Program in Neuropsychiatry and Behavioral Sciences Manhães-de-Castro, Raul ; Federal University of Pernambuco, Studies in Nutrition and Phenotypic Plasticity Unit, Department of Nutrition Monteiro, Luana ; State University of Piauí, Physiotherapy Gouveia, Henrique ; Federal University of Pernambuco, Postgraduate Program in Nutrition Vasconcelos, Emanuel ; Federal University of Pernambuco, Studies in Nutrition and Phenotypic Plasticity Unit, Department of Nutrition Visco, Diego ; Federal University of Pernambuco, Postgraduate Program in Nutrition Toscano, Ana Elisa; Federal University of Pernambuco, Nursing; Federal University of Pernambuco, Studies in Nutrition and Phenotypic Plasticity Unit, Department of Nutrition
Keywords:	Rehabilitation, Motor skills, Muscle Spasticity, Walking, Resistance training

SCHOLARONE™
Manuscripts

ABSTRACT

Background: Resistance exercise is one of the most used among physiotherapists who treat CP patients. **Objective:** To analyze the effect of resistance training in the locomotion of individuals with spastic diplegia. **Methods:** The research was carried out in the databases for articles assessing the effects of resistance training on locomotion-related outcomes in individuals with spastic diplegia at different stages of life. **Results:** The research found a total of eleven studies. There was no standardization of training parameters, and follow-up after the end of the training regimen period was carried out by only a few of them. However, different resistance training programs carried out for at least 6 weeks in children, adolescents, and adults were associated with improvements in locomotion, as well as strength increase. There were no serious adverse effects in all studies. **Conclusion:** The results suggest that resistance training can positively impact motor function and muscle strength in individuals with spastic diplegia. However, further studies should follow the participants for an extended period after the end of the intervention to enable better assessments, as well as evaluate the dose-response focus on strengthening specific muscles and include both objective measures and self-reported functional mobility. Due to the low risk of adverse effects and other health-related benefits, resistance training should continue to be used for these individuals.

Effects of resistance training on the locomotion of individuals with spastic diplegia: a systematic review

Isla Ariadny Amaral de Souza Gonzaga-Paz^{a,b}, Raul Manhães-de-Castro^b, Luana de Moura Monteiro^c, Henrique José Cavalcanti Bezerra Gouveia^{b,d}, Emanuel Ewerton Mendonça Vasconcelos^b, Diego Bulcão Visco^{b,d}, Ana Elisa Toscano^{a,b,d,e}.

^aPostgraduate Program in Neuropsychiatry and Behavioral Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

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

^cState University of Piauí, Teresina, Piauí, Brazil

^dPostgraduate Program in Nutrition, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^eDepartment of Nursing, CAV, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, 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

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Background: Resistance exercise is one of the most used among physiotherapists who treat CP patients. **Objective:** To analyze the effect of resistance training in the locomotion of individuals with spastic diplegia. **Methods:** The research was carried out in the databases for articles assessing the effects of resistance training on locomotion-related outcomes in individuals with spastic diplegia at different stages of life. **Results:** The research found a total of eleven studies. There was no standardization of training parameters, and follow-up after the end of the training regimen period was carried out by only a few of them. However, different resistance training programs carried out for at least 6 weeks in children, adolescents, and adults were associated with improvements in locomotion, as well as strength increase. There were no serious adverse effects in all studies. **Conclusion:** The results suggest that resistance training can positively impact motor function and muscle strength in individuals with spastic diplegia. However, further studies should follow the participants for an extended period after the end of the intervention to enable better assessments, as well as evaluate the dose-response, focus on strengthening specific muscles and include both objective measures and self-reported functional mobility. Due to the low risk of adverse effects and other health-related benefits, resistance training should continue to be used for these individuals.

Keywords: “Rehabilitation”, “Motor skills”, “Muscle Spasticity”, “Walking”, “Resistance training”.

INTRODUCTION

Cerebral palsy (CP) is the most common physical incapacity of children in the developed world, and it occurs in about 2 to 2,5 children per 1000 live births [1]. CP describes a group of abnormalities that are permanent and non-progressive in the developing brain of fetuses or infants leading to disturbances in movement and posture, causing activity limitation and functional impact [2]. CP presents several injuries caused by damage in the immature brain and has a serious cognitive impact on perception and sensation [3]. The CP complexity was defined by the anatomical location of the brain lesion (cerebral cortex, pyramidal tract, extrapyramidal system, or cerebellum) [4]. In the diagnosis of CP, as a consequence of spasticity and malformation of joints, the Gross Motor Function Classification System is used to measure motor alterations [3]. The different spasticity patterns are generally classified as hemiplegic, diplegic, and quadriplegic [5]. Among the main types of CP motor dysfunction (spastic, ataxic, hypotonic, dyskinetic, and mixed), the spastic type is the most frequent [6].

Spastic diplegia is characterized by spasticity predominantly in the lower extremities [6]. Although the causative cerebral lesion is static, children with spastic diplegia typically go through a progression of abnormalities of muscle tone, posture, and gait [7]. As the child ages, progressive spasticity of the hip flexors and hamstrings can result in a crouch gait, which makes prolonged walking difficult, thus giving the appearance of neurological deterioration [8]. An individual with spastic diplegia walks more slowly than an individual in the same conditions without CP and has more difficulty in performing activities such as walking, running, and climbing stairs [9]. Also, the capacity of walking deteriorates with age, making all the concerns with strength and mobility relevant to the preservation and improvement of their ability to move [9]. In fact, around 25% of ambulant adults with cerebral palsy, especially those who are older and presenting bilateral motor impairment, suffer gait decline [10].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Functional motricity affected by the limitations of Cerebral Palsy can be improved with the early therapeutic intervention [11]. Formerly, there was a concern about the possibility of resistance training causing an increase in spasticity [12]. Systematic reviews have shown thenceforward that resistance training can benefit PC patients with respect to function and muscle strength [13–15]. In fact, a recent study shows that resistance exercise is one of the most used among physiotherapists who treat CP patients [16]. However, to promote the musculotendinous adaptation, it is necessary adequate training as well as a duration coherent with the type of structure and the individual to be trained [17]. Meanwhile, the reviews published to date have not evaluated specific types of cerebral palsy.

Several reviews were conducted to assess the effects of resistance training on cerebral palsy. The first systematic review to pool data from randomized trials of strengthening interventions in children and adolescents with cerebral palsy was published in 2009. The authors reported that the intervention does not increase strength or improve activity in cerebral palsy [18]. However, electrical stimulation was included as a strengthening intervention and different types of cerebral palsy were included. The results of another review offer evidence for improving muscle strength in adults with CP after strength training. Likewise, different types of cerebral palsy were included in this review [19]. Later, Collado-Garrido et al. reported a positive impact of resistance therapy on motor function in individuals under 18 years old with CP. The authors did not specify the type of CP and several studies that used functional training were included [14].

It is therefore important to evaluate the effects of resistance training on the motor and muscular abilities of individuals with different types of cerebral palsy separately. Thus, the clarification of such information will be of vital importance to contribute to the strategies of treatment of individuals with motor incapacities. In this context, this review aimed to analyze

the effects of resistance training on the locomotion-related parameters in individuals with spastic diplegia, the most common form of cerebral palsy worldwide.

METHODS

Search strategy

The present systematic review followed the recommendations of the PRISMA statement for transparent reporting of systematic reviews and meta-analyses [20]. This review was duly recorded in the PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews) under the identification number CRD42020202391 and can be accessed online. The study was conducted by two independent evaluators who performed the search in the databases of PubMed / Medline (1966-2021), Embase (1947-2021), Scopus (1950-2021), PEDro (1999-2021), and Web of Science (1900-2021), and a third evaluator was consulted in cases of disagreement. The study selected randomized clinical trials using Boolean operators “AND” and “OR” in the combination of the MESH descriptors (Medical Subject Headings) and keywords: “Cerebral palsy” OR “Spastic diplegia” OR “Bilateral cerebral palsy” OR “Bilateral spastic cerebral palsy” AND “Resistance Training” OR “Resistance Exercise” OR “Strength Training” AND “Locomotion” OR “Walking” OR “Gait” OR “Step” (Table 1). The initial phase of screening was based on the title and abstract regarding the presence of cerebral palsy and resistance training. The full-text screening was based on inclusion/exclusion criteria.

Inclusion and exclusion criterion

Randomized clinical trials involving individuals of both sexes and any age with spastic diplegia were included. If the study did not classify cerebral palsy with spastic diplegia, had no locomotion as an outcome, no physical resistance training, or presented any other methodological design other than a randomized clinical trial, the study was excluded. This review included studies that conducted resistance training programs that included a primary

strength or resistance training program aiming mainly at the lower extremity muscles. Studies that performed only exercises for the upper limbs were excluded. To be included the study should report as primary outcome locomotion-related outcomes (scales such as gross motor function measurement, time up and go, ten meters walk test, lateral step-up, maximal step length, 6-min walk distance, walking speed, steps/day), and strength or other available assessments as a secondary outcome. There was no year and language restriction.

Data extraction

Information extraction on study and program characteristics, as well outcomes were then extracted from articles that met the inclusion criteria independently by the two evaluators and summarized in tables. Study characteristics included participant’s age, sample size, gender, CP classification, and the number of trained individuals (Table 2). Extracted data about the resistance training program included the type of training, number of exercises, frequency, sets and repetitions, evolution, rest time, session time, and intervention duration (including extended follow-up period after the cessation of intervention) (Table 3). The data extracted on the outcomes related to locomotion were presented in Table 4.

Analysis of risk bias

The quality of the articles was evaluated using PEDro Scale (Physiotherapy Evidence Database), which was developed to help users of this database to identify studies that are more likely to have greater internal validity as well as those that have statistical information which adequately guides clinical decision-making [21]. Each of the selected articles is scored on a scale ranging from 0 to 10. Two independent evaluators verified the risk of bias and a third-party evaluator independently verified any divergence between the two. According to that scale, the score was only reached when a criterion was satisfactorily met. If it was not met, this criterion did not receive any score [21]. PEDro Scale presents the reliability of most of the items

from moderate to high by the Kappa index, which is an interobserver index and measures the degree of the agreement only by chance ranged from 0.40 to 0.73, with an average of 0.58. Total PEDro score has a moderate: ICC = 0.54 (95% CI: 0.39 ± 0.71). These reliability coefficients refer to judgments made by a single evaluator. To avoid the possibility of error, the studies are evaluated by 2 evaluators and when there is no consensus among these, the study is evaluated by a third evaluator [21].

RESULTS

Search results

After a first search with the combinations of descriptors selected, 430 articles were identified through an electronic database. After the exclusion of the 138 duplicate articles, and analysis of the 292 titles and abstracts, 74 articles were remaining to a full assessment for eligibility. Finally, 63 articles were excluded, and 11 articles were included in the final analysis. All the studies were published in English. Figure 1 shows the flowchart of the research that shows how this selection was performed.

Study score and classification

The quality of the articles was evaluated using PEDro Scale (Physiotherapy Evidence Database). Of the 11 trials selected for this review, 5 were classified according to the PEDro Scale with quality evaluation at 7 and 8/10. Other 5 studies were rated on 5 and 6/10, and one rated on 4/10 (Table 2), all based on the 11 items on the scale.

Participants

Six studies evaluated people under 19 years old [22–27], two studies were composed of participants between 14 and 22 years old [9, 28], and three studies assessed individuals above 21 years old [12, 29, 30] (Table 3). Participants across all studies were ambulatory, with or without the use of an assistive aid (Gross Motor Functioning Classification System [GMFCS]

level I-III). Therefore, the included studies showed heterogeneities regarding the age groups used. In nine of the eleven studies, participants were assigned to either a resistance training protocol or a control group randomly [9, 12, 23–29]. In one study, participants were randomly assigned to a strength training or a whole-body vibration intervention [30]. One study randomly assigned the participants to a slow or self-paced sit-to-stand training [22].

Characteristics of resistance training

The included studies presented several types of physical resistance training performed in children with spastic diplegia performed using free weights, machines, or bodyweight for the major muscle groups. Four treatment studies used the Sit to Stand (STS) with weight-bearing vest [22, 23], one along with loaded one-step [25], and another along with half-kneeling standing up and side step-up [27]. Two others involved the use of loads from stations or equipment in community gymnasiums [9, 28]. Two studies used exercises designed to target the ankle plantarflexor, dorsiflexors, knee extensor, and hip extensor muscle groups [24, 26]. Two studies applied resistance training in a leg press device [29, 30]. One prescribed exercises for upper and lower limbs [12] (Table 4). The duration of training in the studies ranged from 6 to 12 weeks, being 4 studies for 6 weeks [22–24, 27], 3 studies for 12 weeks [9, 25, 26], 3 studies for 8 weeks [25, 29, 30] and 1 study for 10 weeks [12]. Regarding the frequency of training, almost all studies employed training at least 3 times a week [22–27, 29]. Only 3 studies applied training 2 times a week [9, 12, 28]. The studies used between 1 and 4 sets per day with an amount of 5 to 15 repetitions of each exercise, when applicable [9, 12, 30, 22–29]. The rest between sets varied from 30 seconds to 3 minutes. Training volume and frequency varied in the studies according to the age of the individuals and the type of exercise chosen in the study (Table 4).

Outcome measures

Primary outcomes

The four studies that used STS showed benefits in parameters of locomotion. Liao et al. [23] demonstrated that training for 6 weeks was able to promote one parameter of locomotor activity (GMFM) when compared to a regular physiotherapy group. There were no differences in gait speed [23]. The study conducted by Kusumoto et al. showed an improvement in 6MWD (6-min walk distance), especially in the group that performed the slow STS, after 6 weeks of training. There were no differences in the scale that evaluates the selective control assessment of the lower extremity (SCALE) [22]. Kimoto et al., which also used loaded one step in their study, observed positive effects on MSL (maximum step length) and step length after an 8-week intervention that persisted after an 8-week follow-up period when compared to the control group that received only regular physiotherapy. The change score of walking speed and cadence was not significantly different [25]. Cho and Lee et al. (2020) reported that gross motor function measure (GMFM) in functional ability was significantly increased after functional progressive resistance exercise (sit-to-stand, half-kneeling standing up, and side step-up) for 6 weeks. In the two studies where the progressive resistance training program was performed with weight machines in community gymnasiums, no improvements were seen in locomotion after 12 or 24 weeks [9, 28], however, improvements in self-reported functional mobility (Functional Assessment Questionnaire) were reported [9]. Engsborg et al., focusing on dorsiflexors, plantarflexors or plantarflexors and dorsiflexors for 12 weeks, reported that significant improvements in Gross Motor Function Measure (GMFM) walk-run-jump dimension, and gait kinematics for the entire training group when compared to no strength training control group. Gait speed was not significantly increased [26]. A leg press device was used by two other studies [29, 30]. They reported that the training group did not improve their walking, balance, and gross motor function after 8 weeks [29, 30]. Andersson et al. studied the effects of progressive strength training consisted of ten exercises with emphasis on the lower extremities

for 10 weeks on walking ability. Individuals who did not receive strength training served as controls. They reported improvements in standing and walking dimensions of gross motor function measure, as well walking velocity and balance [12] (Table 5).

Secondary outcomes

Two parameters that are associated with muscle strength and body function (1-RM STS, physiological cost index), PCI (Physiological cost index) were improved in two studies that used only STS [22, 23]. The knee extensor strength was not improved in either study [22, 23]. On the other hand, the study that used STS with half-kneeling standing up and side step-up reported a significant increase in knee extensor strength, muscle tone, and dynamic balance [27]. Evaluating the results obtained after training with weight machines in community gymnasiums, improvements were seen in muscle strength. Bania et al. reported a tendency for an increase in 1RM leg press strength after a 12-week intervention, but not after a 24-week follow-up period [28]. Similarly, Taylor et al. reported increased muscle strength of targeted muscles after 12 weeks [9]. Dodd et al. and Engsberg et al. used exercises designed to target the ankle plantarflexor, dorsiflexors, knee extensor, and hip extensor muscle groups. Dodd et al. described an increase in the ankle plantarflexor-knee extensor strength at six weeks that persisted after a 12-week follow-up period. Also, a beneficial effect on total extensor strength was reported as a trend over the six weeks [24]. Engsberg et al. reported that significant improvements in strength focusing on dorsiflexors, plantarflexors or plantarflexors and dorsiflexors [26]. Using a leg press device, Maeland et al. reported that the training group improved their performance in the leg press, however, did not improve their functional lower limb strength or isokinetic strength after 8 weeks [29]. Alike, Ahlborg et al. reported increased muscle strength without negative effect on spasticity after 8 weeks [30]. Andersson et al. reported improvements in muscle strength after progressive resistance training for 10 weeks focusing on the lower extremities without an increase in spasticity [12].

Adverse effects

Studies that evaluated spasticity after resistance training did not report any worsening of this parameter [12, 26, 30]. One study even reported a significant decrease in spasticity after a 12-week strength training program [26]. There were no serious adverse events in all other studies during and after the resistance training program apart from pressure on the shoulders from the body vest during the loaded STS [23, 24], mild foot and ankle discomfort [24], minor calf strain and minor discomfort to the plantar fascia [9], and short-term muscle soreness [9, 28]. No study reported missed training sessions because of these adverse effects, but rather adjustments in the training program so that it could be continued without further incident.

DISCUSSION

Peer

In this review, we aimed to summarize clinical evidence of the effect of resistance training in the locomotion of individuals with spastic diplegia, the most common form of cerebral palsy. This is the first review, to our knowledge, involving only individuals with spastic diplegia. This review showed that positive changes in locomotion and strength can be obtained from resistance training at different ages. However, our conclusion is based on heterogeneous studies, and only a few of the included articles that observed positive changes carried out an extended follow-up of trial participants after the end of the training regimen period.

Improvements in locomotion and strength have been reported by other review studies with statistical relevance, which reiterates the possibility to use resistance training in individuals with spastic diplegia or other types of cerebral palsy at different stages of life [13–15, 19]. This type of intervention started to be considered for the treatment of this population given the strong association between muscle strength, gross motor function, and mobility [31]. Indeed, muscle weakness has been identified as one of the primary deficits contributing to motor dysfunction

57
58 in individuals with CP [32]. However, the evidence presented in the literature, as well as ours,
59
60 has shown that there is no standardization in the selected clinical trials in the characteristics of

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

the intervention and assessment methods. The inconsistency of the design of the training programs comes from the great variability of the resistance training program (e.g. type, numbers of exercises, intensity, duration), and the numerous instruments used to evaluate the outcomes related to motor function.

The NSCA guidelines state that a resistance program for the youngs should last 8 to 20 weeks [33]. In this review, only two of the studies carried out the intervention for at least 8 weeks in individuals under 19 years old, while the others three held for just 6 weeks. Surprisingly, however, Dodd et al. [24] described an increase in the ankle plantarflexor-knee extensor strength and activities in walking, running, and jumping, as well as stair climbing after six weeks of training that persisted after a 12-week follow-up period without training. Also, all other studies found positive effects of resistance training (6-12 weeks) in at least one locomotion-related outcome [22–27]. These studies used different types of training, including loaded sit-to-stand, bilateral heel raises and half squats, and step-ups, plantarflexors and/or dorsiflexors exercises, loaded one-step, half-kneeling standing up, and side step-up. This result is interesting because two of these studies performed exercises focused directly on the ankle plantarflexors. The ankle plantarflexors, which are muscles that extend the ankle, but not the knee extensors, are the most harmed in individuals with cerebral palsy [34].

The results in studies that included individuals over 18 years of age (age mean $\geq$ 18 years) were, somehow, controversial. Studies that used a leg press device and resistance training in community gymnasiums and lasted from 8 to 12 weeks reported no changes in walking ability, balance, gross motor function [29, 30], and in any objective measure of mobility [9]. Another study reported improvements in muscle strength, standing, and walking dimensions of gross motor function measure, as well walking velocity and balance without an increase in spasticity after 10 weeks of progressive resistance training composed by ten exercises [12]. So, although there is no consensus, it is possible to suggest that this discrepancy in the results is

1
2
3 due to the difference in the applied exercises or even that longer periods of training are needed.
4
5 Also, as stated by the authors of one of the studies, conducting studies in community
6
7 gymnasiums can be a complicated task and less controlled as it could be in a laboratory setting
8
9 [9]. There is a need for longitudinal studies with better age division, considering that one of the
10
11 studies included individuals from 27 to 69 years old [29], besides also evaluating dose-response
12
13 relationship between resistance training and outcomes. More importantly, these results may
14
15 suggest that to achieve a significant improvement in motor function, it is possible that more
16
17 specific strength exercises may need to be performed (i.e. targeting specific muscles that are
18
19 essential to a normal gait pattern), in addition to other types of training such as concurrent
20
21 strength training. As demonstrated in a recent study, when performed with the resistance
22
23 training of the lower limbs, high-intensity functional anaerobic exercise improved the
24
25 functional capacity of young adults [35].
26
27
28
29
30

31 Different tools were used to assess improvements in participants' mobility, including
32
33 6MWD, 10MWT, GMFM, timed stairs test, TUG, self-reported functional mobility, and MSL,
34
35 making comparison difficult. The tools most used by the studies were 6MWD, 10MWT, and
36
37 GMFM. None of the studies reported improvements in the 10MWT test, making this tool the
38
39 only one where no benefits were observed when used in at least two different studies. On the
40
41 other hand, the tool most associated with benefits was the GMFM, especially the dimensions
42
43 D, which evaluates activities in standing, and dimension E, which assesses walking, running,
44
45 and jumping activities [36]. Taylor et al. [9] performed the largest number of measures of
46
47 mobility (6MWD, 10MWT, stairs test, and gross motor function at 12 weeks and 24 weeks)
48
49 and found no significant differences in any of them. Interestingly, there was indeed an
50
51 improvement in self-reported functional mobility (Functional Assessment Questionnaire). The
52
53 authors raised the possibility that resistance training increased the confidence that participants
54
55 had in their mobility or improved aspects that were not evaluated [9]. Thus, the lack of results
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

in objective measures of mobility does not exclude the possibility of improvements in the perception of mobility, an important psychosocial benefit [9]. Also, several studies have already demonstrated beneficial effects on the cardiovascular system and metabolism, making resistance training an important tool for reducing the risk reduction of various diseases and conditions [37–40]. No other study in this review evaluated self-reported functional mobility.

Thereby, future studies must evaluate both objective measures of mobility and self-reported functional mobility. Also, standardization of tools depending on the type of resistance training applied may favor the comparison of future studies. For example, in this review, only loaded sit-to-stand was used by at least three different studies. All studies showed improvements in locomotion, however, there was no standardization in the tools used. One study employed 6MWD, another study used 10MWT and GMFM, and 10MWT and MSL were applied by another.

Strength outcomes from the included studies in our review were reported as secondary outcomes alongside the locomotion-related outcomes. Not all studies where objective benefits in locomotion were found reported increased strength. In the studies where only STS was performed, no change in strength was found, despite benefits in locomotion-related outcomes.

As described by Kusumoto et al. [22], STS exercise results in an isotonic contraction. The muscle contraction used to determine the maximum knee extensor strength was an isometric contraction (dynamometer) in both studies that evaluated the maximum knee extensor strength [22, 23]. Thus, future studies should consider evaluating the isotonic muscle strengthening after the loaded STS movement. Engsberg et al. [26] recorded the maximum torque values for both dorsiflexion and plantarflexion after specific training for these muscles using an isokinetic dynamometer. They found that most subjects increased their strength in the trained muscles [26]. Dodd et al. [24] assessed the strength of the ankle plantarflexors, knee extensors, and hip extensors using a hand-held dynamometer. They reported increased combined ankle

1
2
3 plantarflexor-knee extensor strength, but almost no increase in plantarflexor strength [24].
4
5 These different results may be due to training the ankles in isolation in the first study compared
6
7 to multiple muscles training in the second. Also, using a handheld dynamometer to test ankle
8
9 plantarflexor strength can be challenging and not suitable. Andersson et al. used both an
10
11 isometric hand-held dynamometer and an isokinetic dynamometer. Significant improvements
12
13 were seen in isometric strength and isokinetic concentric work at 30°/s, but not in eccentric
14
15 work. This highlights the importance of performing different tests to assess muscle strength due
16
17 to the strong association between muscle strength, gross motor function, and mobility
18
19 previously addressed [31].
20
21
22
23

24 To our knowledge, no systematic review was conducted evaluating the effects of
25
26 resistance training in individuals with spastic diplegia. However, this review has a few
27
28 limitations. The included studies evaluated the effects of different types of resistance training,
29
30 including volume, frequency, and duration, in addition to different tools to assess the results on
31
32 motor function, which did not allow the performance of meta-analysis. The results of the risk
33
34 of bias tool generally suggest that most of the studies evaluated have a score quality between
35
36 good (5-6 points out of 10) and excellent (7-8 points out of 10), which could be associated with
37
38 the randomization, allocation, similarity between groups at the beginning of the intervention,
39
40 blinding of the evaluators and at least one key result was obtained in more than 85% of the
41
42 subjects initially distributed by the groups. However, only a few of the included articles that
43
44 observed positive changes carried out an extended follow-up of trial participants after the end
45
46 of the training regimen period, reducing the confidence of the results obtained. On the other
47
48 hand, all studies performed progressive resistance training considering that it is known that
49
50 resistance training needs to progress due to the adaptation and strengthening of the musculature
51
52 [33]. This implies the need for future studies must continue to progress their training intensity
53
54 throughout the program to evaluate the importance of training on motor function in individuals
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

with cerebral palsy at different ages. This review also highlights that the articles included in this study reported any or very few unimportant adverse effects, especially in spasticity. One study even reported a significant decrease in spasticity after a 12-week strength training program [26]. This reinforces the importance of resistance training to continue to be applied to these individuals even without improvements in objective measures of mobility.

CONCLUSIONS

The evidence presented in this systematic review offers limited evidence in support of a resistance training program as a strategy to improve motor function in individuals with spastic diplegia. However, due to the low risk of adverse effects and other health-related benefits, resistance training should continue to be used for these individuals. Further studies should: follow the participants for an extended period after the end of the intervention to enable better assessments of motor function; evaluate the dose-response relationship between resistance training and outcomes; focus on strengthening specific muscles that are essential to a normal gait pattern; and consider including both objective measures and self-reported functional mobility to assess the effects of training.

CLINICAL MESSAGES

- This review showed that positive changes in locomotion and strength can be obtained from resistance training carried out for at least 6 weeks at different ages for individuals with spastic diplegia, despite the need for further studies.
- Different resistance training programs were associated with improvements in locomotion, including loaded sit-to-stand, full-body training, and specific dorsiflexors-plantarflexors training.
- Due to the low risk of adverse effects and other health-related benefits, resistance training should continue to be used for individuals with spastic diplegia. Studies that

evaluated spasticity after resistance training did not report any worsening of this parameter.

- Objective measures and self-reported functional mobility can and should be used by the studies to assess the effects of training.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ); Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE); and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Isla A. A. S. G. Paz and Henrique J. C. B. Gouveia conducted the search and selection of articles, as well as extracting the results. Emanuel E. M. Vasconcelos and Diego B. analyzed the quality of selected studies. Luana M. Monteiro was consulted in cases of disagreement at all stages. Isla A. A. S. G. Paz and Henrique J. C. B. Gouveia wrote the manuscript in consultation with Raul M. Castro and Ana E. Toscano.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The Authors declares that there is no conflict of interest.

FUNDING

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

[1] Odding E, Roebroek ME, Stam HJ. The epidemiology of cerebral palsy: Incidence, impairments and risk factors. *Disabil Rehabil* 2006; 28: 183–191.

[2] Bax M, Goldstein M, Rosenbaun P, et al. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Dev Med Child Neurol* 2005; 47: 571.

[3] Degerstedt F, Wiklund M, Enberg B. Physiotherapeutic interventions and physical activity for children in Northern Sweden with cerebral palsy: A register study from equity and gender perspectives. *Glob Health Action* 2017; 10: 1–10.

[4] Sanger TD, Delgado MR, Gaebler-Spira D, et al. Classification and definition of disorders causing hypertonia in childhood. *Pediatrics* 2003; 111: e89-97.

[5] Pons R, Vanezis A, Skouteli H, et al. Upper Limb Function, Kinematic Analysis, and Dystonia Assessment in Children with Spastic Diplegic Cerebral Palsy and Periventricular Leukomalacia. *J Child Neurol* 2017; 32: 936–941.

[6] Huntsman R, Lemire E, Norton J, et al. The differential diagnosis of spastic diplegia. *Arch Dis Child* 2015; 100: 500–504.

[7] Rodda J, Graham HK. Classification of gait patterns in spastic hemiplegia and spastic diplegia: A basis for a management algorithm. *Eur J Neurol* 2001; 8: 98–108.

[8] Yokochi K. Gait patterns in children with spastic diplegia and periventricular leukomalacia. *Brain Dev* 2001; 23: 34–37.

[9] Taylor NF, Dodd KJ, Baker RJ, et al. Progressive resistance training and mobility-

- related function in young people with cerebral palsy: A randomized controlled trial. *Dev Med Child Neurol* 2013; 55: 806–812.
- [10] Morgan P, McGinley J. Gait function and decline in adults with cerebral palsy: A systematic review. *Disabil Rehabil* 2014; 36: 1–9.
- [11] Morgan C, Darrah J, Gordon AM, et al. Effectiveness of motor interventions in infants with cerebral palsy: a systematic review. *Dev Med Child Neurol* 2016; 58: 900–909.
- [12] Andersson C, Grooten W, Hellsten M, et al. Adults with cerebral palsy: Walking ability after progressive strength training. *Dev Med Child Neurol* 2003; 45: 220–228.
- [13] Dodd KJ, Taylor NF, Damiano DL. A systematic review of the effectiveness of strength-training programs for people with cerebral palsy. *Arch Phys Med Rehabil* 2002; 83: 1157–1164.
- [14] Collado-Garrido L, Parás-Bravo P, Santibáñez-Margüello M, et al. Impact of resistance therapy on motor function in children with cerebral palsy: A systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health*; 16. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3390/ijerph16224513.
- [15] Park E-YE-Y, Kim W-HW-H. Meta-analysis of the effect of strengthening interventions in individuals with cerebral palsy. *Res Dev Disabil* 2014; 35: 239–249.
- [16] Taflampas G, Kilbride C, Levin W, 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. *Phys Occup Ther Pediatr* 2018; 38: 355–369.
- [17] Ryan JM, Lavelle G, Theis N, et al. Progressive resistance training for adolescents with cerebral palsy: the STAR randomized controlled trial. *Dev Med Child Neurol* 2020; 62: 1283–1293.
- [18] Scianni A, Butler JM, Ada L, et al. Muscle strengthening is not effective in children

- and adolescents with cerebral palsy: a systematic review. *Aust J Physiother* 2009; 55: 81–87.
- [19] Ross SM, Macdonald M, Bigouette JP. Effects of strength training on mobility in adults with cerebral palsy: A systematic review. *Disabil Health J* 2016; 9: 375–384.
- [20] Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ*; 339. Epub ahead of print 2009. DOI: 10.1136/bmj.b2700.
- [21] Maher CG, Sherrington C, Herbert RD, et al. Reliability of the PEDro scale for rating quality of randomized controlled trials. *Phys Ther* 2003; 83: 713–721.
- [22] Kusumoto Y, Nitta O, Takaki K. Impact of loaded sit-to-stand exercises at different speeds on the physiological cost of walking in children with spastic diplegia: A single-blind randomized clinical trial. *Res Dev Disabil* 2016; 57: 85–91.
- [23] Liao HF, Liu YC, Liu WY, et al. Effectiveness of Loaded Sit-to-Stand Resistance Exercise for Children With Mild Spastic Diplegia: A Randomized Clinical Trial. *Arch Phys Med Rehabil* 2007; 88: 25–31.
- [24] Dodd KJ, Taylor NF, Graham HK. A randomized clinical trial of strength training in young people with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2003; 45: 652–657.
- [25] Kimoto M, Yonetsu R, Okada K, et al. Effect of home-based training focused on increasing maximum step length in walking function of children with cerebral palsy. *Phys Ther Rev* 2019; 24: 358–365.
- [26] Engsberg JR, Ross SA, Collins DR. Increasing ankle strength to improve gait and function in children with cerebral palsy: A pilot study. *Pediatr Phys Ther* 2006; 18: 266–275.
- [27] Cho H-J, Lee B-H. Effect of Functional Progressive Resistance Exercise on Lower

- Extremity Structure, Muscle Tone, Dynamic Balance and Functional Ability in Children with Spastic Cerebral Palsy. *Children* 2020; 7: 85.
- [28] Bania TA, Dodd KJ, Baker RJ, et al. The effects of progressive resistance training on daily physical activity in young people with cerebral palsy: A randomised controlled trial. *Disabil Rehabil* 2016; 38: 620–626.
- [29] Maeland S, Jahnsen R, Opheim A, et al. No effect on gait function of progressive resistance exercise in adults with cerebral palsy A single-blind randomized controlled trial. *Adv Physiother* 2009; 11: 227–233.
- [30] Ahlborg L, Andersson C, Julin P. Whole-body vibration training compared with resistance training: Effect on spasticity, muscle strength and motor performance in adults with cerebral palsy. *J Rehabil Med* 2006; 38: 302–308.
- [31] Ross SA, Engsberg JR. Relationships Between Spasticity, Strength, Gait, and the GMFM-66 in Persons With Spastic Diplegia Cerebral Palsy. *Arch Phys Med Rehabil* 2007; 88: 1114–1120.
- [32] Damiano DL, Vaughan CL, Abel ME. MUSCLE RESPONSE TO HEAVY RESISTANCE EXERCISE IN CHILDREN WITH SPASTIC CEREBRAL PALSY. *Dev Med & Child Neurol* 1995; 37: 731–739.
- [33] Faigenbaum AD, Kraemer WJ, Blimkie CJR, et al. Youth Resistance Training: Updated Position Statement Paper From the National Strength and Conditioning Association. *J Strength Cond Res* 2009; 23: S60–S79.
- [34] Eek MN, Tranberg R, Zügner R, et al. Muscle strength training to improve gait function in children with cerebral palsy. *Dev Med Child Neurol* 2008; 50: 759–764.
- [35] Gillett JG, Lichtwark GA, Boyd RN, et al. Functional anaerobic and strength training in young adults with cerebral palsy. *Med Sci Sports Exerc* 2018; 50: 1549–1557.
- [36] Michaelis U. Gross Motor Function Measure (GMFM-66 & GMFM 88) User's

Manual 2nd Edition Clinics in Developmental Medicine Edited by Dianne J Russell,
Peter L Rosenbaum, Marilyn Wright, Lisa M Avery London, UK: Mac Keith Press,
2013 £70.00 (Spiral Binding), pp 290 . *Dev Med Child Neurol* 2015; 57: 1188–1188.

[37] Hamer M, Chida Y. Physical activity and risk of neurodegenerative disease: A
systematic review of prospective evidence. *Psychol Med* 2008; 39: 3–11.

[38] Lancaster GI, Febbraio MA. The immunomodulating role of exercise in metabolic
disease. *Trends Immunol* 2014; 35: 262–269.

[39] Mantoani LC, Dell’Era S, MacNee W, et al. Physical activity in patients with COPD:
the impact of comorbidities. *Expert Rev Respir Med* 2017; 11: 685–698.

[40] Nystoriak MA, Bhatnagar A. Cardiovascular Effects and Benefits of Exercise. *Front
Cardiovasc Med* 2018; 5: 1–11.

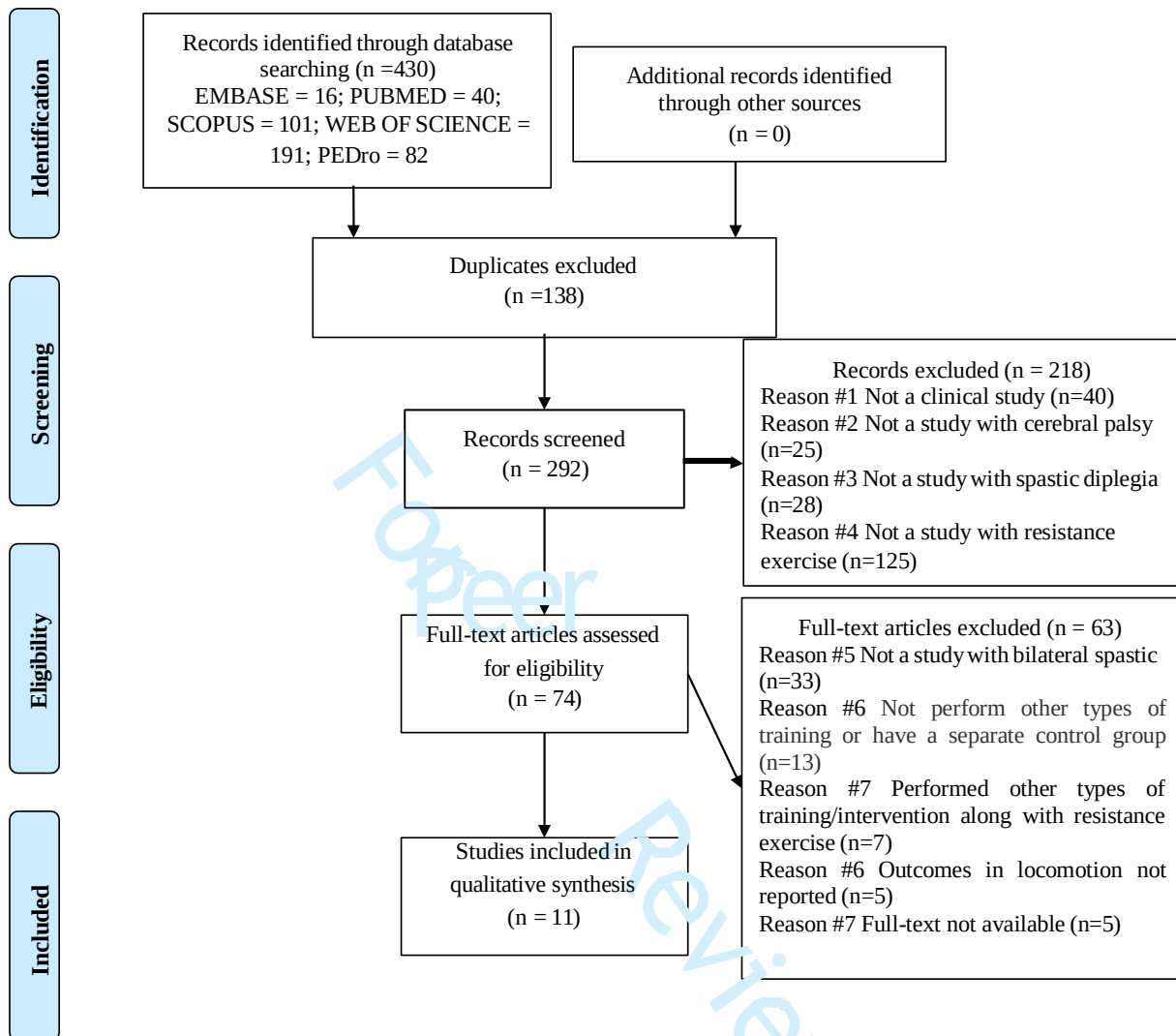


Figure 1. PRISMA flow diagram of study selection process.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1.
Standard terms used in search strategy.

Search strategy	
Component	Terms/Boolean operators
Population	(cerebral palsy*) OR (spastic diplegia) OR (bilateral cerebral palsy) OR (bilateral spastic cerebral palsy)
AND	
Intervention	(resistance training*) OR (resistance exercise) OR (strength training)
AND	
Outcomes	(locomotion*) OR (gait*) OR (walking*) OR (step)

Note: the terms used varied according to the requirements of the database. *MESH terms.

Table 2: Bias risk analysis

Authors/year	PEDRO SCALE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Kusumoto, Nittab, Takaki (2016) [22]	8/10	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Liao et al. (2007) [23]	5/10	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
Dodd et al. (2003) [24]	6/10	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+
Maeland et al. (2009) [29]	7/10	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
Bania et al. (2016) [28]	6/10	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
Ahlborg et al. (2006) [30]	7/10	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Taylor et al. (2013) [9]	7/10	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
Andersson, et al. (2003) [12]	6/10	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
Engsberg, et al. (2006) [26]	4/10	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+
Kimoto et al. (2019) [25]	7/10	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
Cho and Lee (2020) [27]	6/10	+	+		+		-	-				

Table: 1. "Were the eligibility criteria specified? 2. Subjects were randomly assigned to groups (in a cross-over study, subjects were randomly placed in groups according to treatment received); 3. Was the subject allocation secret? 4. Initially, were the groups similar in terms of the most important prognostic indicators?; 5. Did all subjects blindly participate in the study?; 6. Did all the therapists who administered the therapy do it blindly?; 7. Did all the evaluators who measured at least one key result do so blindly?; 8. Were measurements of at least one key result obtained in more than 85% of the subjects initially distributed by the groups?; 9. Did all subjects from which outcome measures submitted receive the treatment or control condition according to the allocation or, where this was not the case, were the data analyzed for at least one of the key outcomes by "Intention to treat"?; 10. Were the results of inter-group statistical comparisons described for at least one key outcome?; 11. Does the study present both precision measures and measures of variability for at least one key outcome? "Criterion 1) regarding the external validity (or" applicability "of the clinical trial or "potential of generalization") was maintained so that the Delphi list is complete, but this criterion will not be used to calculate the PEDro score presented at the PEDro web address; (+) YES (-) NO.

Table 3.
Study characteristics

Author(s)/ Year	Age mean and/or range	Sample size	Gender (M/F)	Gross Motor Function Classification System	Trained individuals
Kusumoto, Nittab, Takaki (2016) [22]	12-18	16	16/0	I-III	16
Liao et al. (2007) [23]	5-12	20	12/8	I-II	10
Dodd et al. (2003) [24]	13.1 (8-18)	21	10/11	I-III	11
Maeland et al. (2009) [29]	43.0 (27-69)	12	4/8	II-III	6
Bania et al. (2016) [28]	18.7 (14-22)	36	18/18	II-III	15
Ahlborg et al. (2006) [30]	31.2 (21-41)	14	8/6	I-III	7
Taylor et al. (2013) [9]	18.1 (14-21)	48	26/22	II-III	23
Andersson et al. (2003) [12]	31.4 (23-47)	17	11/7	Ambulatory with aids	10
Engsberg et al. (2006) [26]	9.7 (SD 3.52)	12	3/9	I-III	9
Kimoto et al. (2019) [25]	10.1 (4-19)	21	14/7	I-II	10
Cho and Lee (2020) [27]	6-13	25	12/13	I-III	13

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

Table 4.

Resistance training characteristics

Author(s)/ Year	Type of training (design)	Number of exercises	Frequency	Sets (reps)	Evolution	Rest time between sets	Session time	Intervention duration (extended follow-up)
Kusumoto, Nittab, Takaki (2016) [22]	Loaded sit-to-stand (slow vs self-paced [5 s sit-to- stand + 5s stand-to-sit])	1	3-4x/week	4 sets/day (10 reps) starting with 30% 1-RM	Load adjustments of each trial with increased 1 to 4kg	min	15 min	6 weeks (0)
				3 sets/day (1x 10 repetitions with 20% 1-RM, 1x with 50% 1-RM, and 1x with 20% 1-RM)	Load adjustments to 50% of 1-RM STS every 2 weeks according to the 1-RM STS results of the latest loaded STS test		20-30 min	
Liao et al. (2007) [23]	Loaded sit-to-stand (experimental vs control)	1	3x/week			min		6 weeks (0)
	Ankle plantarflexor, knee extensor, and hip				Load adjustments at the end			
Dodd et al. (2003) [24]	extensor exercises: Bilateral heel raises and half squats, and step-ups (experimental vs control)	3	3x/week	3 sets/day (8-10 reps of each)	of the second and fourth week (targeting 8 to 12 reps)	-	20-30 min	6 weeks (+12)
	Seated leg press			4 sets/day (2 weeks, 12-15 reps weeks 4-6 reps with 85% 1-	Load adjustments to 60-75% of 1-RM for 2 weeks and			

33Maeland et al. 34(2009) [29] 35	(experimental vs control)	1	3x/week	with 60-85% 1-RM and (6 RM)	85% 1-RM for 6 weeks. Load increase (5-10 kg) was used when necessary	3 min	-	8 weeks
---	---------------------------	---	---------	--------------------------------	---	-------	---	---------

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

1									
2									
3									
4	Bania et al.	Community gymnasiums	6	2x/week	2-3 sets (10-12 reps)	Load adjustments when participants could complete 3 sets of 12 repetitions	-	-	12 weeks
5	(2016) [28]	(experimental vs control)							(+12)
6									
7									
8									
9	Ahlborg et al.	Leg press device	1	3x/week	3 sets (10-15 reps) 70% 1-RM	After the first or second week the load was about 70% of 1 RM	2 min	-	8 weeks
10	(2006) [30]	(resistance training vs whole-body vibration)							
11									
12									
13									
14									
15	Taylor et al.	Community gymnasiums	4-6	2x/week	3 sets (10-12 reps) 60% to 80% 1-RM	When able to complete three sets of 12 repetitions of an exercise, the weight to be lifted was increased at the next session	2 min	-	12 weeks
16	(2013) [9]	(experimental vs control)							(+12)
17									
18									
19									
20		Exercises with emphasis			3 sets (10 reps of each) 70% 1-	Load adjustments when the participant managed to do more than 10 repetitions per set	-	-	10 weeks
21	Andersson et al.	on the lower extremities	10	2x/week	RM				
22	(2003) [12]	(experimental vs control)							
23									
24									
25									
26					3 sets (five repetitions at 30 degrees per second concentrically and	Load was equal to or greater than 80% of 1-RM with the			
27		Isokinetic dynamometer:							
28	Engsberg et al.	Plantarflexors and/or							
29									
30	(2006) [26]	dorsiflexors exercises	1-2	3x/week	eccentrically) + 3 sets (five repetitions at 90 degrees per second concentrically and eccentrically)	maximum being determined at the beginning of each training session	2 min	-	12 weeks
31		(experimental vs control)							
32									
33									
34									
35		One-step and loaded sit-			2 sets of one-step (10 reps of				
36	Kimoto et al.								
37	(2019) [25]	38 to-stand (experimental vs control)				2 3x/week each)	80% of maximum step length		
38		39							

Load adjustments to 50% - - 8 weeks (+8)

1- n
RM at 2, 4 and 6 weeks
5
0
%
1
-
R
M
s
i
t
-
t
o
-
s
t
a
n
d

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

Cho and Lee (2020) [27]	Sit to stand, half-kneeling standing up and side step-up (experimental vs control)	3	3x/week	5 reps in first two weeks, 10 times in weeks three and four, and 15 times in the last two weeks	Weight was increased every two weeks by 5%, 10% and 35% based on their body weight	30 s – 1 min	30 min	6 weeks
----------------------------	---	---	---------	--	---	-----------------	--------	---------

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

Table 5.

Locomotion-related outcomes

Author(s)/ Year	6MWD	10MWT	GMFM	Timed stairs test	TUG	Self-reported functional mobility	MSL	Steps/day
Kusumoto, Nittab, Takaki (2016) [22]	1	-	-	-	-	-	-	-
Liao et al. (2007) [23]	-	0	1	-	-	-	-	-
Dodd et al. (2003) [24]	-	0	1	1	-	-	-	-
Maeland et al. (2009) [29]	0	0	-	0	-	-	-	-
Bania et al. (2016) [28]	-	-	-	-	-	-	-	0
Ahlborg et al. (2006) [30]	0	-	0	-	0	-	-	-
Taylor et al. (2013) [9]	0	0	0	0	-	1	-	-
Andersson et al. (2003) [12]	1	-	1	-	1	-	-	-
Engsberg et al. (2006) [26]	-	0	1	-	-	-	-	-
Kimoto et al. (2019) [25]	-	0	-	-	-	-	1	-
Cho and Lee (2020) [27]	-	-	1	-	-	-	-	-

WD, 6-minute walk test; 10MWT, 10 meter walk test; GMFM, gross motor function measure; TUG, timed up and go; MSL, maximum step length. “0” and “1” means change or improvement in the parameter, respectively. “-” means parameters not evaluated.