



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

THALLYANY LIEUTHIANA DOS SANTOS GENTIL

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA: REPERCUSSÕES DO TRATAMENTO NEONATAL
COM VITAMINA D SOBRE A MATURAÇÃO SOMÁTICA, REFLEXA E DA
MARCHA NA PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Recife
2024

THALLYANY LIEUTHIANA DOS SANTOS GENTIL

**PLASTICIDADE FENOTÍPICA: REPERCUSSÕES DO TRATAMENTO NEONATAL
COM VITAMINA D SOBRE A MATURAÇÃO SOMÁTICA, REFLEXA E DA
MARCHA NA PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Farmácia da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Elisa Toscano
Coorientadora: Me. Márcia Maria da Silva

Recife
2024

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

Gentil, Thallyany Lieuthiana dos Santos.

Plasticidade fenotípica: repercussões do tratamento neonatal com vitamina D sobre a maturação somática, reflexa e da marcha na paralisia cerebral experimental. / Thallyany Lieuthiana dos Santos Gentil. - Recife, 2024.
42 : il., tab.

Orientador(a): Ana Elisa Toscano

Coorientador(a): Márcia Maria da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2024.

Inclui referências, apêndices.

1. Paralisia cerebral. 2. Vitamina D. 3. Estudo experimental. I. Toscano, Ana Elisa. (Orientação). II. Silva, Márcia Maria da. (Coorientação). IV. Título.

570 CDD (22.ed.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



Aprovada em: 25/03/2024.

BANCA EXAMINADORA

Ma. Márcia Maria da Silva
(Coorientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Ricardo Brandão
(Presidente e Examinador)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Henrique José Cavalcanti Bezerra Gouveia
(Examinador)
Universidade Federal de Pernambuco

Me. Luan Kelwyny Thaywã Marques da Silva
(Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho às duas mulheres mais diferentes e fortes que já conheci,
Norma e Martha, minha mãe e minha tia, eu sou a soma delas.

AGRADECIMENTOS

Quero começar essa página agradecendo a mulher que mesmo nunca tendo pisado em uma universidade e nem tido o ensino superior como uma opção de realidade de vida, nunca questionou a minha decisão e nunca duvidou que eu conseguiria alcançar esse objetivo, ela acreditou em mim mais do que eu mesma. Ela, mesmo sabendo que teria que passar mais anos me sustentando, sem ter um salário fixo, com seus 50 anos trabalhando carregando peso para levar a mercadoria até seus clientes, nunca pediu para eu desistir, pelo contrário, sempre procurava uma solução para que minhas condições melhorassem, ela sabia que eu tinha feito a melhor escolha. Sou fruto de uma mãe solteira, uma super mulher, ela me mostrou que eu consigo fazer tudo que eu quiser fazer sozinha, ela me ensinou a ser forte e a me impor, por isso que meu primeiro agradecimento é para ela, minha mãe.

A segunda mulher que preciso mencionar exclusivamente é a minha segunda mãe, ela que me ensinou a ter empatia, e o que é se doar pelo próximo. Ela é a mulher mais bondosa que conheço, e mais amorosa também, ela é o espelho que tento seguir para ser uma pessoa melhor. Ela sempre fez tudo por mim e nunca soltou a minha mão, obrigada por tudo, titia.

Também não posso passar por esse momento sem agradecer imensamente a toda a rede de apoio que construí nesta fase, eu sempre tive facilidade para me comunicar com as pessoas e isso é um parâmetro importante para criar laços, mas existem pessoas que você não cria laços, você se conecta, e não importa o tempo que passe e a distância tudo permanece igual, esse é o significado de amizade. Não conseguiria citar o nome de todos aqui, mas estas pessoas foram a família que formei no mundo e eu nunca estive sozinha longe de casa por causa deles, vocês sempre estarão presentes nas minhas melhores memórias e eu sei que vou levá-las comigo para o resto da vida, aos meus amigos, obrigada.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco pela estrutura, oportunidades e recursos durante toda a minha graduação. À Dra. Ana Elisa Toscano, por me aceitar como sua orientanda e por me dar a oportunidade de ter a experiência na pesquisa científica na Unidade de Estudos em Nutrição e Plasticidade Fenotípica, a Doutoranda Márcia Maria da Silva por me acolher de uma forma inexplicável em sua equipe de pesquisa e me ensinar tudo do zero com toda a paciência do mundo, por aceitar ser minha coorientadora, sem ela esse trabalho não seria possível.

Por fim, eu agradeço a mim, por sempre acreditar que ia dar certo e por não desistir, mesmo quando parecia que o abismo entre o meu conhecimento e o dos meus colegas de turma era imenso. Por sempre ter a mente bem focada e comprometida com o objetivo de vida. Por perseverar e chegar até aqui.

“E um homem não me define
Minha casa não me define
Minha carne não me define
(eu sou o meu próprio lar)”

- Francisco, el Hombre
(Triste, Louca ou Má, 2016).

RESUMO

A Paralisia Cerebral (PC) é uma causa comum de deficiência física na infância, causando uma inflamação crônica que afeta todo o desenvolvimento neuromotor, resultando em frequente incapacidade motora em crianças. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento neonatal com Vitamina D no desenvolvimento do sistema músculo-esquelético em ratos *Wistar* machos submetidos à paralisia cerebral. Para isso, os animais foram randomizados em quatro grupos, 1) Controle + Veículo (CV; n=10); 2) Controle + Vitamina D (CD; n=10); 3) Paralisia Cerebral + Veículo (PCV; n=10); 4) Paralisia Cerebral + Vitamina D (PCD; n=10), utilizando o modelo de paralisia experimental que consistiu na combinação de anóxia perinatal associado a restrição sensorio-motora das patas posteriores, e a partir da execução rigorosa das avaliações foi possível a análise estatística de dados. Os principais resultados obtidos mostraram que a Vitamina D ocasionou um aumento do peso corporal dos animais do grupo PCD em relação ao PCV ($p<0,05$), nos dias 7 e 30 pós-natal, além de evidenciar um aumento no crescimento corporal dos animais CD em relação aos CV ($p= 0,0014$) no P60, mostrando um efeito positivo no fenótipo corporal desses ratos suplementados com a VitD. Entretanto, na maturação física e nos reflexos os grupos experimentais demonstraram um retardo no desenvolvimento quando comparado aos grupos controles ($p<0,05$), não apresentando diferenças significativas entre os modelos PCD e PCV. Da mesma forma, na análise de marcha os animais submetidos a PC apresentaram uma diminuição em todos os parâmetros avaliados, sendo na área máxima de contato ($p<0,05$) nos P30 e P59, na intensidade máxima de máximo contato ($p<0,05$) no P30, e na média do ciclo de trabalho ($p<0,05$), indicando que a VitD não foi capaz de atenuar esse déficit nas condições e parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Paralisia cerebral; Ratos; Vitamina D; Neonatal; Desenvolvimento neuromotor.

ABSTRACT

Cerebral Palsy (CP) is a common cause of physical disability in childhood, causing chronic inflammation that affects the entire neuromotor development, resulting in frequent motor impairment in children. The aim of this study was to evaluate the effect of neonatal treatment with Vitamin D on the development of the musculoskeletal system in male Wistar rats subjected to cerebral palsy. For this purpose, the animals were randomized into four groups, 1) Control + Vehicle (CV; n=10); 2) Control + Vitamin D (CD; n=10); 3) Cerebral Palsy + Vehicle (CPV; n=10); 4) Cerebral Palsy + Vitamin D (CPD; n=10), using the experimental paralysis model consisting of a combination of perinatal anoxia associated with sensorimotor hindlimb restriction, and through the rigorous execution of evaluations, statistical analysis of data was possible. The main results obtained showed that Vitamin D caused an increase in body weight of animals in the CPD group compared to CPV ($p<0.05$), on postnatal days 7 and 30, besides showing an increase in body growth of CD animals compared to CV ($p=0.0014$) on P60, demonstrating a positive effect on the body phenotype of these rats supplemented with VitD. However, in physical maturation and reflexes, the experimental groups showed a delay in development compared to the control groups ($p<0.05$), with no significant differences between the CPD and CPV models. Similarly, in gait analysis, animals subjected to CP showed a decrease in all evaluated parameters, being in the maximum contact area ($p<0.05$) on days 30 and 59, in the maximum contact intensity ($p<0.05$) on day 30, and in the mean duty cycle ($p<0.05$), indicating that VitD was not able to attenuate this deficit under the evaluated conditions and parameters.

Keywords: Cerebral Palsy; Rats; Vitamin D; Neonatal; Neuromotor Development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Restrição sensório-motora	28
Figura 2 –	Peso e avaliação murinométrica	32
Figura 3 –	Avaliação da marcha em Catwalk	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ontogênese dos reflexos e maturação física

33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	– Asfixia Perinatal
CD	– Controle Vitamina D
CV	– Controle Veículo
EHl	– Encefalopatia hipóxia-isquêmica
NAC	– N-acetilcisteína
PC	– Paralisia Cerebral
PCD	– Paralisia Cerebral Vitamina D
PCV	– Paralisia Cerebral Veículo
P0	– Dia do nascimento
P1	– Primeiro dia de vida pós-natal
P7	– Dia 7 de vida pós-natal
P30	– Dia 30 de vida pós-natal
P60	– Dia 60 de vida pós-natal
SNC	– Sistema Nervoso Central
VDR	– Receptor de Vitamina D
VitD	– Vitamina D
1,25D	– 1,25-Dihidroxitamina D ou calcitriol
1,25D-VDR-RXR	– Heterodímero

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1	PARALISIA CEREBRAL	19
3.2	PLASTICIDADE FENOTÍPICA	20
3.3	COMPOSIÇÃO NEUROMOTORA: NERVOSO, MÚSCULO E OSSO	21
3.4	VITAMINA D NO MÚSCULO ESQUELÉTICO	23
3.5	SUPLEMENTAÇÃO DE VITAMINA D	24
4	METODOLOGIA	27
4.1	ANIMAIS	27
4.2	PARALISIA CEREBRAL EXPERIMENTAL	27
4.3	ADMINISTRAÇÃO NEONATAL DE VITAMINA D OU VEÍCULO	28
4.4	ANÁLISES EXPERIMENTAIS	29
4.4.1	<i>Avaliação da caracterização somática e medidas murinométricas</i>	29
4.4.2	<i>Avaliação da ontogênese dos reflexos e maturação física</i>	29
4.4.3	<i>Análise da marcha em Catwalk</i>	30
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5	RESULTADOS	31
5.1	PESO E AVALIAÇÕES MURINOMÉTRICAS	31
5.2	ONTOGÊNESE DOS REFLEXOS E MATURAÇÃO FÍSICA	32
5.3	ANÁLISE DE MARCHA EM CATWALK	33
6	DISCUSSÃO	35
7	CONCLUSÃO	38

8	REFERÊNCIAS	39
9	ANEXO A	42

1. INTRODUÇÃO

A Paralisia Cerebral (PC) é o resultado decorrente de uma lesão não progressiva ocorrida no cérebro fetal ou infantil, sendo descrita como um conjunto de distúrbios do movimento da postura. Ela se apresenta como causa frequente de incapacidade motora em crianças, porque afeta todo o seu desenvolvimento neuromotor, desencadeando várias limitações no perfil de funcionalidade da pessoa (Sadowska *et al.*, 2020).

Assim, a lesão cerebral interrompe o desenvolvimento e a função normal do cérebro, levando a vários tipos de distúrbios de movimento e limitações na capacidade funcional, e os indivíduos acometidos pela PC apresentam um quadro de processo inflamatório que pode levar a problemas, como a maior ativação e o aumento no número de astrócitos e micróglia no tecido nervoso (Machado *et al.*, 2020). Embora a inflamação possa estar presente como uma resposta secundária à lesão cerebral inicial, ela não é a principal causa do dano motor na paralisia cerebral, essa ineficiência funcional motora é causada por mecanismos complexos e multifatoriais decorrentes do comprometimento do sistema nervoso (Machado *et al.*, 2020).

Nesse contexto, entende-se como plasticidade fenotípica a capacidade de desenvolver ou produzir diferentes fenótipos, a partir de um mesmo genótipo, em resposta aos estímulos do ambiente (West-Eberhard, 2003). Estudos afirmam que a melhor fase para serem feitas essas intervenções, com o intuito de reverter ou minimizar distúrbios patológicos, é em fases iniciais da vida, como a infância (Gluckman *et al.*, 2007). Dessa forma, tratando-se do sistema locomotor, uma intervenção farmacológica precoce, se apresenta como uma alternativa promissora para melhora do quadro de pacientes com PC a longo prazo (Gluckman *et al.*, 2007).

Em virtude disso, a vitamina D é um hormônio que se destaca nesse sentido por apresentar funções no sistema músculo-esquelético, por meio da absorção de cálcio ósseo e no processo de força e função muscular (Dirks-Naylor *et al.*, 2011). Alguns estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, comprovaram que o tratamento com essa substância provocou uma aceleração na absorção do cálcio pelos miócitos (Bauman *et al.*, 1984). Em paralelo a isso, um estudo realizados apenas em animais evidenciaram que o músculo em desenvolvimento apresenta uma expressão bem

maior de receptores para vitamina D (VDR) quando comparado às células musculares maduras (Boland *et al.*, 1986), e que testes feitos com um modelo de estudo em animais que não expressam VDR nos músculos, resultaram em uma notável disfunção do sistema neuromotor (Minasyan *et al.*, 2009).

Ademais, em estudos experimentais, a partir da utilização de modelos de paralisia cerebral induzida, é possível simular os efeitos gerados pela PC em humanos (Marcuzzo *et al.*, 2008). Sabe-se, que não existem muitas estratégias de intervenções farmacológicas atuantes no desenvolvimento infantil para o manejo da PC, logo após a lesão neurológica. Sendo assim, a vitamina D destaca-se como uma alternativa potencialmente eficaz na melhoria do desenvolvimento do sistema motor desses indivíduos.

Então, por meio desse estudo pretende-se avaliar e elucidar a ação desse hormônio nos parâmetros locomotores, nos ratos *Wistar* machos submetidos a um modelo de paralisia cerebral experimental.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar o efeito do tratamento neonatal com Vitamina D no desenvolvimento do sistema músculo-esquelético em ratos *Wistar* machos submetidos à paralisia cerebral.

2.2 Objetivos específicos:

Nesses animais submetidos a paralisia cerebral com tratamento neonatal com a Vitamina D, serão avaliados:

- Caracterização somática;
- Medidas murinométricas;
- Ontogênese dos reflexos;
- Marcha em Catwalk.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Paralisia cerebral

A Paralisia Cerebral é caracterizada como um distúrbio resultante de uma lesão ocorrida no cérebro ainda em desenvolvimento, gerando uma deficiência motora, e seu grau de complicação varia do estágio de desenvolvimento e do local em que ocorreu essa lesão, além da apresentação clínica do paciente (Colver *et al.*, 2014). A PC é uma causa comum de deficiência física na infância que afeta o sistema nervoso central em fase de maturação, daí sua importância clínica, por gerar acentuada neuroinflamação (dos Santos, 2014), que por sua vez resultam em disfunções motoras crônicas (Colver *et al.*, 2014).

Em termos epidemiológicos, as condições socioeconômicas do país vão interferir diretamente na incidência da PC, no caso dos países subdesenvolvidos a taxa de crianças nascidas com esse distúrbio é de 7 para cada 1.000 nascidos vivos (Zanini *et al.*, 2009), sendo registrados anualmente de 30.000 a 40.000 novos casos (Mancini *et al.*, 2002). Já nos países desenvolvidos, essa incidência é menor, com uma média de 1,6 crianças a cada 1.000 nascidos vivos (Mcintyres *et al.*, 2022).

As evidências científicas mostram que o comprometimento motor desses indivíduos resultam em menor condicionamento físico por apresentarem menos massa muscular, além de uma redução na densidade óssea, levando a uma diminuição na sua eficiência neuromuscular (Cremer *et al.*, 2017). Este fato, atrelado a idade adulta desses indivíduos, apresenta-se como um risco em potencial de desencadear vários problemas de saúde secundários, como a obesidade, que pode levar a doenças cardiometabólicas, declínios nas reservas funcionais, maior fragilidade corporal, além de uma piora na qualidade de vida e dificuldade em estabelecer relações sociais (Cremer *et al.*, 2017).

A asfria perinatal ainda é tida como uma das principais causas de PC e de mortalidade neonatal, ocasionando em danos permanentes no desenvolvimento neurológico que pode acontecer na fase fetal ou neonatal, além de infecções maternas, que também é um fator de alto risco para a PC (COQ *et al.*, 2008). No geral, o primeiro trimestre está mais associado ao mau desenvolvimento cerebral, como a esquizencefalia (malformação rara do desenvolvimento cortical), no segundo trimestre se refere mais a lesão da substância branca periventricular e no terceiro

trimestre a lesão é associada a substância cinzenta, sendo um dano cortical e mais profundo (Krägeloh-Mann & Cans, 2009).

Alguns estudos utilizam o modelo experimental que associa anóxia perinatal e restrição sensório-motora em roedores para induzir a paralisia cerebral nesses animais e avaliar algum parâmetro, este modelo também foi associado à desnutrição perinatal e conseguiu verificar déficits na estrutura dos músculos mastigatórios (Cabral *et al.*, 2017).

Já outros estudos, mais focados em parâmetros locomotores, utilizando esse mesmo modelo experimental de PC, verificou-se que a desnutrição potencializou os efeitos prejudiciais desse distúrbio neurológico, impactando também na atrofia muscular, mostrando a importância da nutrição adequada para a musculatura desses indivíduos (Silva *et al.*, 2016).

Além disso, esses modelos experimentais de autores como Strata *et al.* (2004), Coq *et al.* (2008), Marcuzzo *et al.* (2008, 2010) tem contribuído muito para o campo das pesquisas (Marcuzzo *et al.*, 2010). Estes, se apresentam como modelos importantes por serem simples, de fácil reprodução e baixo custo, podendo avaliar o desempenho motor do animal durante o período de escolha quando submetidos às mesmas condições (Marcuzzo *et al.*, 2010).

A anóxia perinatal é a responsável primária nesse modelo pela lesão neurológica, mas a restrição sensório-motora atua como um fator de alteração motora nesses animais (Marcuzzo *et al.*, 2008). Esta restrição tem como intuito ocasionar danos acentuados ao desenvolvimento do sistema locomotor, prejudicando-o, sendo de máxima importância para performar e experienciar o perfil encontrado nas crianças a PC, por isso, é um modelo muito utilizado e bem estabelecido cientificamente (Marcuzzo *et al.*, 2008). É um modelo que assemelha seus resultados aos quadros induzidos por denervação no animal, diminuindo o tamanho das fibras dos músculos e que com a associação a anóxia perinatal podem ser potencializados (Coq *et al.*, 2008).

3.2. Plasticidade fenotípica

Para a plasticidade fenotípica, o período tido como uma ótima fase de intervenção é o perinatal, pois toda mudança realizada nesse período pode ser refletida a longo prazo, já que atua diretamente na fase de desenvolvimento do

organismo, podendo ser de grande importância na vida adulta (Gluckman *et al.*, 2007). No âmbito da nutrição, por exemplo, alterações realizadas durante esse período crítico (fase fetal, neonatal e infância), podem levar a mudanças significativas no metabolismo e estrutura funcional do indivíduo (Perng & Oken, 2017).

Para analisar o desenvolvimento motor humano inicial, a melhor idade é no período entre 2 e 4 meses pós-termo, considerada uma idade de grande transição (Hadders-Algra, 2018; Prechtl, 1984), e atualmente, existem duas teorias que predominam e servem de base para analisar esse assunto, a Teoria dos Sistemas Dinâmicos (DTS) (Smith & Thelen, 2003 ; Spencer *et al.*, 2011; Thelen, 1995; Ulrich, 1997) e a Teoria da Seleção de Grupos Neurais (NGST) (Edelman, 1989, 1993; Hadders-Algra, 2000, 2010). Apesar de não serem teorias complementares e divergirem sobre aspectos geneticamente determinados do neurodesenvolvimento, ambas reconhecem a experiência e o contexto no qual a criança está inserida como partes fundamentais do desenvolvimento motor (Hadders-Algra, 2018). Dessa forma, colocam como um processo não linear que pode ser afetado por fatores individuais de cada criança, como peso, potência muscular, condições socioeconômicas familiar, doenças genéticas, rotina de cuidados, dentre outros (Hadders-Algra, 2018).

Nesse contexto, a abordagem da anóxia associada com a restrição para induzir a PC nos animais traz um dano maior aos movimentos e a locomoção, semelhante ao que acontece às crianças que apresentam esse distúrbio, por isso, é importante realizar a intervenção precocemente, visando gerar menos impacto ao desenvolvimento neuropsicomotor (Marcuzzo *et al.*, 2010). Dessa forma, modelos experimentais de PC são amplamente aceitos para serem testadas novas terapias, e quanto mais cedo essas intervenções acontecem, melhor para analisar como esse organismo vai se comportar, e se vai ocorrer uma atenuação dos efeitos ou uma diminuição das sequelas no desenvolvimento do sistema nervoso (Clowry *et al.*, 2014).

3.3. Composição neuromotora: nervoso, músculo e osso

De maneira geral, o nosso sistema nervoso é composto por neurônios e células da glia, estas últimas possuem várias funções importantes para o

desenvolvimento cerebral e são as responsáveis pela manutenção das sinapses (Jessen, 2004). Para que a integração entre os sistemas seja possível, é necessário que o sistema nervoso se desenvolva e mature de forma correta, assim, a capacidade de locomoção é preservada (da Conceição Pereira *et al.*, 2021).

Nesse contexto, quando é gerada uma lesão neste tecido, as glias em sua maioria respondem com rápida proliferação e algumas delas como os astrócitos hipertrofiam formando uma cicatriz glial, impedindo a regeneração (Jessen, 2004). Essas alterações nos mecanismos de reparo e da neurogênese podem levar a um dano no desenvolvimento motor (Visco *et al.*, 2021).

Ademais, o tecido muscular esquelético é uma parte fundamental do sistema locomotor, podendo compreender cerca de 40% do nosso peso total. Sua função estrutural, regulatória e contrátil é responsável por contribuir para a saúde, mobilidade corporal, capacidade e força para se exercitar (Frontera *et al.*, 2015).

Esse músculo, tem como menor unidade estrutural e funcional a miofibrila, que são estruturas contráteis dentro do miócito compostas de actina e miosina, estas, são organizadas em sarcômeros que são as unidades contráteis funcionais do músculo (Berchtold *et al.*, 2000). A velocidade de contração do músculo será diretamente dependente das vias metabólicas, e as fibras musculares além de apresentarem a capacidade de transição de um tipo para outro também podem sofrer atrofia (Scott *et al.*, 2001). As fibras do tipo II, são as responsáveis pela contração rápida (glicolítica rápida) dos músculos esqueléticos, quando associadas a quadros de deficiência de vitamina D podem resultar em atrofia, principalmente dessas fibras específicas (Sato *et al.*, 2005).

Já os ossos, se apresentam como uma estrutura de sustentação para esse sistema, ou seja, oferecem sustentação, suporte, proteção e auxiliam na locomoção. As células que estão presentes em sua composição (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos) possuem receptores para a VitD (Bikle, 2012).

A PC é uma das condições infantis que mais se associa à osteoporose, visto que esta tem sua origem na infância, quando o acúmulo de massa óssea não ocorre de forma otimizada nesses primeiros estágios da vida (Houlihan & Stevenson, 2009). Alguns pesquisadores utilizam modelos de animais para analisar perda óssea induzida por desuso, eles são úteis tanto para elucidar a patogênese subjacente à

perda óssea como também para testar opções de tratamento farmacêutico (Brent *et al.*, 2020). Dessa forma, o desenvolvimento adequado dos tecidos ósseo e muscular, bem como do tecido nervoso, está relacionado com o desenvolvimento e especialização da capacidade motora.

3.4. Vitamina D no músculo esquelético

A vitamina D é um hormônio lipossolúvel, que primariamente é dito como uma substância que desempenha um papel vital na absorção intestinal do fosfato de cálcio e do magnésio, e que exerce funções que auxiliam no metabolismo dos ossos e dentes, porém, já existem evidências de que essa molécula também é um importante agente envolvido no processo de força e função muscular, além de auxiliar na resposta imunológica (Girgis *et al.*, 2013).

Estudos realizados de forma *in vitro* comprovaram alguns mecanismos realizados por esse hormônio que tem ação direta nos músculos, esses mecanismos foram divididos em: a) Efeitos genômicos a partir de uma ligação entre receptores nucleares específicos e o 1,25D-VDR-RXR (heterodímero) modulando a transcrição gênica, e b) Efeitos não genômicos, a partir da interação entre receptores não nucleares e o 1,25-Dihidroxivitamina D (1,25D ou Calcitriol, metabólito ativo, diretamente relacionado a função renal) (Dirks-Naylor *et al.*, 2011). O tratamento com o calcitriol é responsável pelo aumento da quantidade de cálcio absorvida pelos músculos, tanto de forma *in vitro* como *in vivo* (Bauman *et al.*, 1984).

Pesquisadores que estudaram um modelo de camundongo com deleção modificada do receptor de vitamina D (VDR) ajudaram a esclarecer mais sobre a função biológica exercida por esse hormônio, pois esse fenótipo consegue assemelhar a condição de um humano com deficiência grave de VitD, e essa deficiência está associada ao aumento da prevalência de doenças em humanos (Bouillon *et al.*, 2008). O músculo em desenvolvimento apresenta uma expressão bem maior de receptores para vitamina D (VDR) quando comparado às células musculares maduras (Boland *et al.*, 1986).

Outro estudo realizado analisou histologicamente os músculos do quadríceps de camundongos sob o modelo de deleção de VDR em diferentes estágios de desenvolvimento, e quando comparados aos animais saudáveis notou-se uma redução relevante de tamanho de fibras tanto do tipo I como do tipo II, além de uma

maior variação no diâmetro das mesmas, com 21 dias de vida (Endo *et al.*, 2003). Em seguida, as próximas análises foram realizadas no 56º dia de vida, estas, evidenciam uma notável progressão no quadro desses animais com a apresentação de uma atrofia generalizada dessas fibras juntamente a descoberta de alterações bioquímicas que antes não estavam presentes, atentando para a atuação do VDR no desenvolvimento morfológico dos músculos (Endo *et al.*, 2003). Mesmo em um modelo em que esses animais foram submetidos a uma dieta rica desses íons, cálcio e fósforo, e lactose, ainda sim essas alterações se mantiveram, o que sugere o VDR como mediador importante nesse metabolismo e como principal causa dessas alterações (Girgis *et al.*, 2013).

Outro teste que analisou a coordenação motora e a capacidade de natação do rato, constatou déficits na função motora no genótipo que apresentava a deficiência de VDR (Kalueff *et al.*, 2004). Um estudo feito para avaliar coordenação motora, utilizando o teste do rotarod, mostrou que esses animais permaneceram no dispositivo por um tempo menor em relação aos animais controle, nos testes de aceleração e de velocidade fixa, já no teste de campo aberto, esses animais percorreram uma menor distância com passos bem mais curtos que os camundongos selvagens, mostrando um prejuízo na marcha dos mesmo (Burne *et al.*, 2006).

Em síntese, em todos os testes realizados com esse modelo de estudo de animais, no qual não expressam VDR nos músculos, resultaram em uma notável disfunção motora geral, evidenciando a importante participação desse hormônio na função muscular (Minasyan *et al.*, 2009).

3.5. Suplementação de Vitamina D

A vitamina D tem um papel funcional conhecido relacionado a saúde óssea e homeostase do cálcio, mas vários estudos recentes estão trazendo esse hormônio como uma nova alternativa em potencial para tratamentos neuroprotetores no SNC (Menéndez & Manucha, 2024). A neuroinflamação é uma resposta imunológica do nosso cérebro a algum processo de estresse, e essa situação pode levar a doenças degenerativas (Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla) ou outros distúrbios metabólicos, como a PC (Menéndez & Manucha, 2024).

Espera-se que a suplementação do colecalciferol (D3), atue como imunomodulador, regulando mediadores inflamatórios e contribuindo para a neurogênese e a plasticidade sináptica, resultando em efeitos neuroprotetores, como sugerem ensaios pré-clínicos (Menéndez & Manucha, 2024). Mesmo sendo necessário estudos clínicos para assegurar essa atividade e melhorar a compreensão sobre a nova função dessa substância, a VitD é colocada atualmente como um potencial alvo de novas estratégias de complemento para terapias contra patologias que estão associadas a neuroinflamação, já que ela afeta a síntese de neurotransmissores e consequentemente a plasticidade cerebral (Menéndez & Manucha, 2024).

Além disso, outro ensaio pré-clínico realizado por pesquisadores norte-americanos que utilizaram um modelo de intervenção farmacológica de N-acetilcisteína (NAC) + hipotermia em associação com VitD, no tratamento de encefalopatia hipóxica-isquêmica (EHI) neonatal para avaliar o efeito imunomodulador da VitD, demonstrou que esses animais obtiveram resultados melhores na força e habilidades sensório-motoras, em comparação ao tratamento sem a VitD (Lowe *et al.*, 2017). Esses resultados foram melhores refletidos nos machos, que apresentaram melhor desempenho nos testes de uso do membro afetado, mostrando assim a influência que a VitD exerce sobre a função motora dos animais ao tratar um dano neuronal (Lowe *et al.*, 2017).

Nesse caso, a N-acetilcisteína atua como antioxidante fornecendo substrato para a síntese da glutathione, essa ação diminui o estresse oxidativo pela eliminação de radicais livres, esse mecanismo é possível porque esse fármaco possui a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica com facilidade (Holmay *et al.*, 2013; Katz *et al.*, 2015). Nesse contexto, o suporte fornecido pela NAC principalmente após uma EIH grave, forneceria um cenário melhor para atuação da VitD, que teria função imunomoduladora de neuroproteção em ambos os sexos, já que ela também atravessa a barreira hematoencefálica e atua de forma independente em células neuronais (Fernandes de Abreu *et al.*, 2009).

Os níveis deste hormônio mostram-se como extremamente importantes para o desenvolvimento neuronal normal quando em quantidades suficientes (Groves *et al.*, 2014; Cui *et al.*, 2007), já que quando ocorre neuroinflamação, a sua forma ativa

acaba sendo degradada em modelos de ratos adultos (Balden *et al.*, 2012; Paintlia *et al.*, 2012). Assim, procuramos descrever se o tratamento neonatal com VitD pode beneficiar o desenvolvimento neuromotor de animais submetidos a um modelo experimental de paralisia cerebral.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais:

Foram utilizados 40 machos da linhagem Wistar, descendentes de 34 ratas progenitoras da colônia do Biotério de criação situado no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. As condições ambientes do biotério foram as seguintes: Temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$; Ciclo claro-escuro de 12/12 horas; e livre acesso à água e alimentação padrão. Assim que nascidos, os filhotes foram ajustados em oito por ninhada, com pesagem entre 6-8 gramas no primeiro dia pós-natal e permaneceram com suas genitoras durante todo o período de lactação. Esses animais foram distribuídos em subgrupos de forma aleatória, sendo:

- 1) Controle + Veículo (CV; n=10);
- 2) Controle + Vitamina D (CD; n=10);
- 3) Paralisia Cerebral + Veículo (PCV; n=10);
- 4) Paralisia Cerebral + Vitamina D (PCD; n=10).

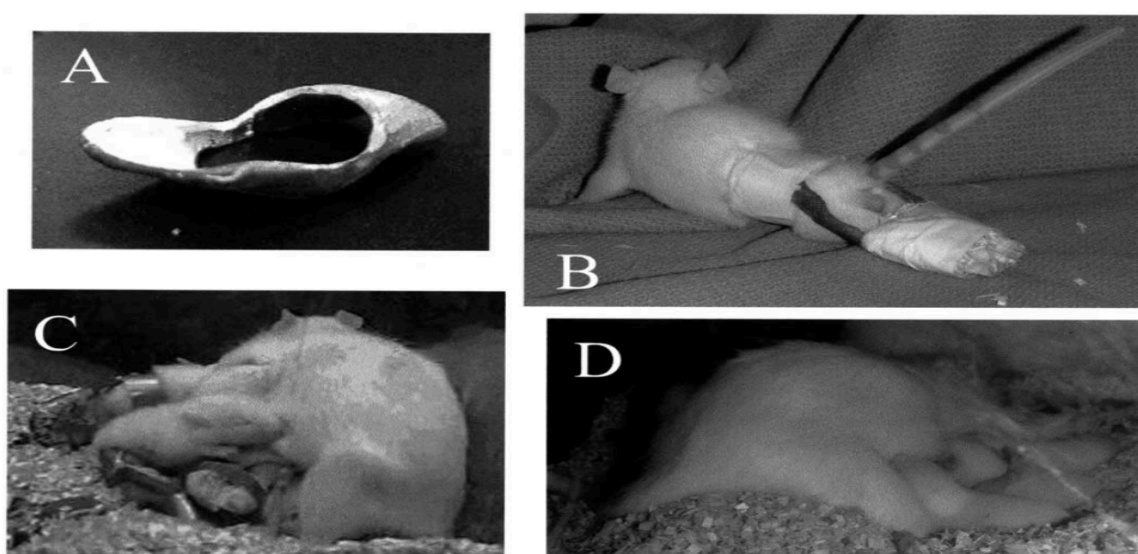
O desmame foi realizado no dia 25 pós-natal (P25) e os animais foram separados em gaiolas contendo de 3 a 4 ratos, até o dia 60 pós-natal, quando foram eutanasiados. Este projeto seguiu todas as normas do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal, assim como as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals e foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da UFPE (Anexo A; Processo nº 104/2021, Ofício nº 21/22).

4.2. Paralisia cerebral experimental:

Os animais dos subgrupos da Paralisia Cerebral foram submetidos ao modelo experimental de paralisia cerebral adaptado por Coq *et al.* (2008) e Lacerda *et al.* (2017). É um modelo que associa a anóxia perinatal com um modelo de restrição sensório-motora dos membros inferiores para simular a falta de movimento que ocorre na PC. Logo após nascerem, esses filhotes foram submetidos à anóxia duas vezes, a primeira no chamado P0 (dia do nascimento) e posteriormente no P1 (primeiro dia de vida pós-natal). Em seguida, a restrição sensório-motora foi

realizada dos dias 2 até o dia 28 pós-natal nos membros inferiores utilizando um molde feito de epóxi, preso ao animal por meio de fita micropore e esparadrapo, durante 16 horas por dia e nas demais horas restantes eles possuíam livre movimentação dentro da gaiola, o formato desses moldes são preparados para que as patas posteriores sejam fixadas mas não impeça que os animais consigam executar suas necessidades fisiológicas, como também se alimentar e receber os cuidados maternos.

Figura 1: Restrição sensório-motora



(Autor: Strata *et al.*, 2004)

Restrição sensório-motora. (A) Exemplificando como funciona o molde de epóxi, moldado à mão, usado para a restrição diária de movimentos em torno das articulações dos membros posteriores. Uma extremidade fica em contato com o dorso do animal e a outra em contato com a parte anterior das pernas e pés. O tamanho varia de acordo com a idade do animal. (B) Imagem de um filhote com os membros inferiores presos ao molde, na forma de restrição. (C) Fotografia dos animais submetidos a PC recebendo alimentação e cuidados por parte da mãe. (D) Fotografia dos filhotes do grupo controle recebendo alimentação e os cuidados maternos.

4.3. Administração neonatal de Vitamina D ou Veículo:

Para estabelecer um protocolo de aplicação de Vitamina D foi utilizado o estudo adaptado de Mehri *et al.* (2020), onde os filhotes receberam a dose de $5\mu\text{g/kg/dia}$ de VitD (Cholecalciferol-Sigma-Aldrich, USA), dissolvida em uma solução Veículo composta por água destilada e monolaurato de polioxietileno sorbitano. Dessa forma, os animais dos grupos Vitamina D ou Veículo receberam o tratamento

entre o P2 e P30 de vida pós-natal, a via utilizada para essa administração foi a intraperitoneal.

4.4. Análises experimentais:

4.4.1. Avaliação da caracterização somática: Durante os dias 07, 30 e 60, foram avaliados os seguintes parâmetros - peso corporal, comprimentos naso-anal, os eixos do crânio latero-lateral e antero-posterior dos filhotes. O alimento e a água foram alocados individualmente nas gaiolas e os filhotes tinham livre acesso a eles.

4.4.2. Avaliação da ontogênese dos reflexos: Foi avaliado entre os P1 e P21 de vida pós-natal o surgimento e desaparecimento dos reflexos que estão diretamente relacionados ao desenvolvimento e maturação do sistema motor. Só é considerado de fato o dia da maturação quando o reflexo se mostrar de forma completa por 3 dias consecutivos, sendo o primeiro dia dessa sequência o dia da maturação do reflexo. Dentre eles, estão:

Reflexo de Bar holding (BH) - O animal é colocado a uma distância de 10 cm da superfície, onde deve segurar com as patas dianteiras na régua de forma fixa e se manter sem cair por até 10 segundos;

Reflexo de geotaxia negativa (GN) - O animal é colocado no centro de uma rampa com 45° de inclinação, com a cabeça no sentido descendente e ele deve girar e conseguir posicionar a cabeça em sentido ascendente em relação a essa rampa em até 10 segundos;

Reflexo de queda livre (QL) - O animal deve ser posicionado a uma altura de 30 cm em um leito de algodão segurado pelas quatro patas em decúbito dorsal, e ao ser solto deve realizar um giro em queda livre para apoiar-se sobre as quatro patas ao pousar no leito;

Reflexo de recuperação de decúbito (RD) - O animal é posicionado em decúbito dorsal sobre uma superfície e deve realizar um giro de corpo para decúbito ventral em até 10 segundos;

Reflexo de resposta ao susto (RS) - O animal é submetido a um som agudo rápido e deve apresentar rápida retração com a imobilização involuntária do seu corpo do animal em resposta ao estímulo.

4.4.3. Análise da marcha em Catwalk: Marcha avaliada individualmente por meio do aparelho de Catwalk nos dias 21, 30 e 58 de vida pós-natal. Ocorre da seguinte forma, o animal se desloca numa passarela onde cada movimento dele é registrado para posteriormente ser analisado, e a partir daí é possível mensurar os parâmetros estáticos (duração de passos, fase de estação e fase de oscilação da marcha) e dinâmicos (coordenação espaço temporal entre os membros, padrões de passo entre as patas e a magnitude da pressão das pegadas) de cada um deles. Dentre os inúmeros parâmetros que podem ser analisados no Catwalk, os de escolha para esse trabalho foram:

Área máxima de contato (cm^2): É definida como a área máxima de uma pata que entra em contato com a placa de vidro;

Intensidade máxima de máximo contato: Mede a intensidade máxima de uma pata em contato máximo;

Ciclo de passos: Descreve o tempo em segundos entre dois contatos iniciais consecutivos da mesma pata;

Ciclo de trabalho: Expressa a porcentagem do momento em que a pata toca na passarela em relação ao ciclo completo de passos do animal.

4.5. Análise Estatística:

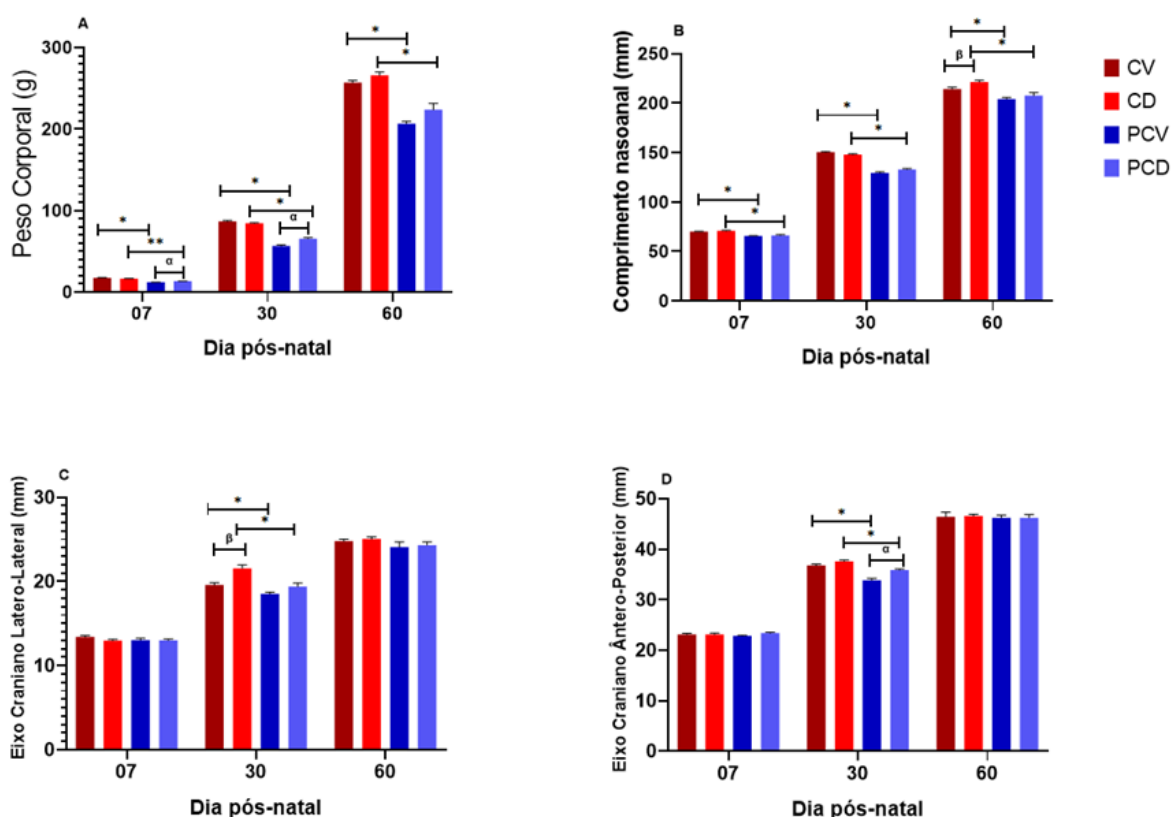
Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. (erro padrão da média) ou mediana (mínimo-máximo). A análise de normalidade da amostra foi analisada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados considerados paramétricos, a comparação entre os grupos foi realizada por meio do ANOVA two way ou two way medidas repetidas, seguidos do pós-teste de Tukey. Quando foram não paramétricos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn's. As análises foram realizadas no GraphPad PRISM (versão 8.0.2) e o nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Peso e avaliações murinométricas

Avaliando os dados dos animais, houve diferença significativa entre os grupos no peso corporal [$F(3, 36) = 78,14$; $p < 0,0001$], no comprimento nasoanal [$F(3, 36) = 77,19$; $p < 0,0001$], no eixo látero-lateral do crânio [$F(3, 36) = 8,622$; $p = 0,0002$] e no eixo anteroposterior do crânio [$F(3, 36) = 5,877$; $p = 0,0003$]. Com relação ao peso corporal, houve redução significativa ocasionada pelo modelo experimental nos dias 7, 30 e 60 tanto nos animais que receberam veículo quanto nos animais que receberam VitD quando comparado aos seus respectivos controles (pós-teste de Tukey: $p < 0,0001$. Figura 2A). Ainda, houve aumento do peso corporal nos animais PC que receberam VitD quando comparado aos animais que receberam veículo nos dias 7 e 30 (pós-teste de Tukey: $p < 0,05$. Figura 2A).

Nas medidas murinométricas, houve redução ocasionada pelo modelo experimental entre ambos os grupos no comprimento nasoanal nos dias 7, 30 e 60 (pós-teste de Tukey: $p < 0,05$. Figura 2B). Houve diferenças também entre os grupos controles (CV vs. CD) no P60, (pós-teste de Tukey: $p = 0,0411$). No tocante aos eixos do crânio, houve redução ocasionada pelo modelo experimental entre ambos os grupos quando comparados aos seus respectivos controles no eixo látero-lateral no dia 30, além de aumento nos animais controle que receberam VitD comparados aos que receberam veículo (pós-teste de Tukey: $p < 0,05$. Figura 2C). No eixo anteroposterior, a PC ocasionou redução quando comparado aos controles no dia 30 (pós-teste de Tukey: $p < 0,05$. Figura 2D). Interessantemente, os animais PC que receberam a VitD apresentaram maior eixo anteroposterior, quando comparados aos animais que receberam veículo (pós-teste de Tukey: $p = 0,0014$. Figura 2D).

Figura 2: Peso e avaliação murinométrica.

Avaliação do desenvolvimento do peso corporal e das medidas murinométricas dos machos nas idades alvos P7, P30 e P60. A- Peso corporal, B- Comprimento nasoanal, C- Eixo craniano látero-lateral, D- Eixo craniano anteroposterior. ANOVA two-way múltiplas comparações e teste post-hoc de Tukey's. n por grupo= 10. A composição dos grupos está de acordo com intervenção com vitamina D ou veículo e modelo de paralisia cerebral ou controle. * = CV vs. PCV; ** = CD vs PCD; β = CV vs. CD; α = PCV vs. PCD; $p < 0,05$.

5.2 Ontogênese dos reflexos e maturação física

Durante o período de lactação (P1 ao P21), os animais de cada grupo foram analisados a ontogênese de reflexos e quanto à maturação das características físicas. Observou-se diferenças entre os grupos analisados no surgimento dos reflexos e na maturação física [$F(3, 44) = 43,11$; $p < 0,0001$]. Os animais dos grupos PCV e PCD apresentaram retardo no aparecimento dos reflexos bar holding, geotaxia negativa, queda livre e reflexo de susto, quando comparados com seus respectivos controles. Já em relação à maturação das características físicas, os animais submetidos ao modelo apresentam também retardo na erupção dos

incisivos superiores e na abertura ocular. Não houve diferença significativa entre os animais PC 's que receberam VitD, quando comparados aos PC que receberam veículo (Tabela 1).

Tabela 1: Ontogênese dos reflexos e maturação física.

	Grupos			
	CV	CD	PCV	PCD
Reflexos				
Bar holding	14,5 (12-18)	13,5 (13-16)	17 (14-18)*	16,5 (13-18)**
Geotaxia negativa	15 (13-16)	14,5 (13-16)	17 (15-21)*	17 (15-17)**
Queda livre	14 (12-16)	14 (12-16)	17 (14-18)*	17 (14-17)**
Recuperação de decúbito	5 (5-6)	5 (3-6)	6 (4-7)	5,5 (4-7)
Reflexo de susto	13 (11-14)	13 (11-15)	15 (13-18)*	14,5 (12-16)**
Maturação das características físicas				
Erupção dos incisivos superiores	10 (8-12)	10 (7-12)	13,5 (10-15)*	13 (10-14)**
Erupção dos incisivos inferiores	9 (7-12)	10 (7-12)	11,5 (10-13)	11,5 (10-12)
Abertura ocular	13,5 (13-15)	14 (13-14)	15 (15-16)*	15 (14-16)**

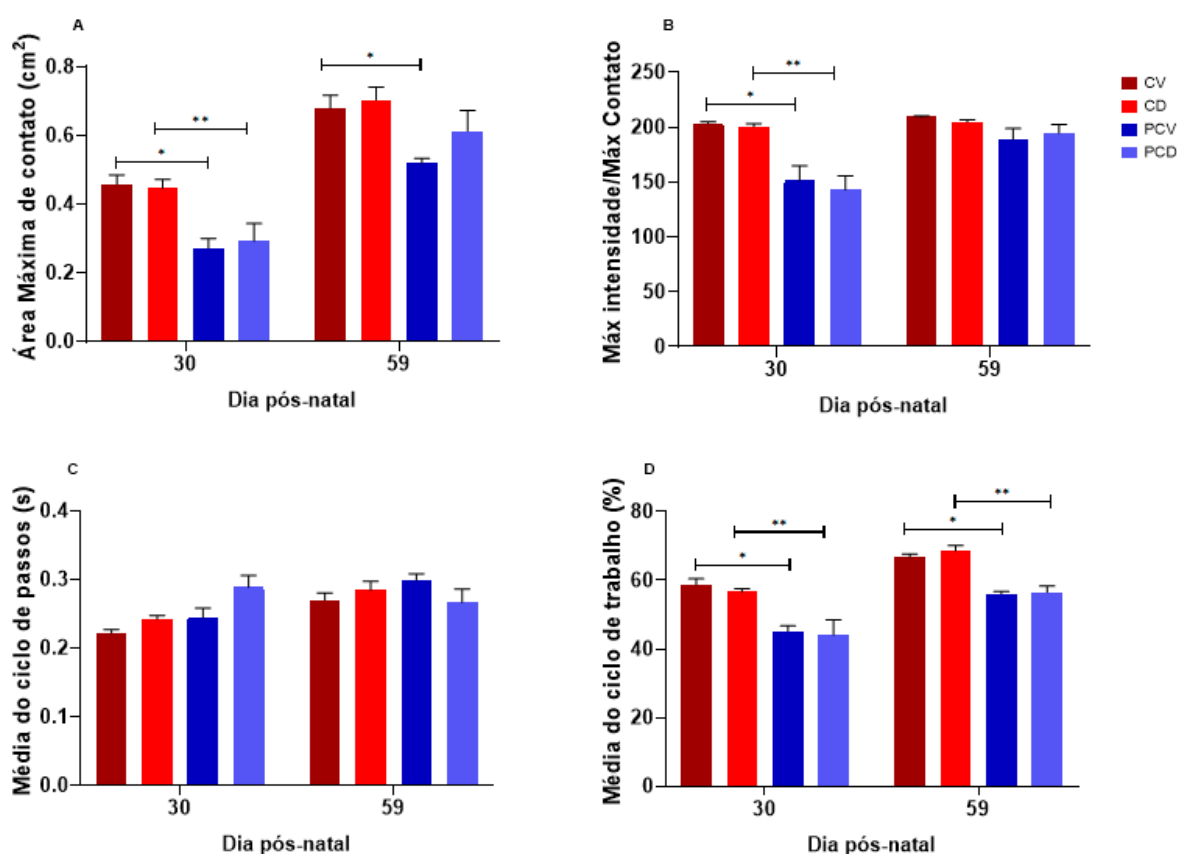
Análise da ontogênese dos reflexos e maturação física. Valores representam mediana (mínimo-máximo). ANOVA two-way múltiplas comparações e teste post-hoc de Tukey's. n por grupo= 12. *= PCV vs. CV; **=PCD vs. CD. $p<0,05$.

5.3 Análise da marcha em Catwalk XT

Avaliando os dados dos animais, houve diferença significativa entre os grupos na área máxima de contato [$F(3, 36) = 8,656; p=0,0002$], na máxima intensidade no máximo contato [$F(3, 36) = 15,03; p<0,0001$], e na média do ciclo de trabalho [$F(3, 36) = 24,46; p<0,0001$]. Os animais dos grupos paralisia apresentaram menor área máxima de contato quando comparados aos seus respectivos controles no P30 e no P59 os animais PCV mantiveram essa diminuição (pós-teste de Tukey: $p<0,05$. Figura 3A). No P30 os animais do grupo paralisia apresentaram diminuição no que

concerne à intensidade máxima de máximo contato (pós-teste de Tukey: $p < 0,05$. Figura 3B). A média do ciclo de trabalho (proporção do tempo de apoio de uma pata em relação ao ciclo completo do passo) apresentou-se comprometido pelo modelo, com os animais dos grupos paralisia apresentando diminuição do parâmetro (pós-teste de Tukey: $p < 0,05$. Figura 3D).

Figura 3: Avaliação de marcha em Catwalk.



Avaliação da marcha em Catwalk dos animais nas idades alvos P30 e P59. A- Área Máxima de contato (cm²), B-Máx intensidade/Máx Contato, C-Média do ciclo de passos (s), D-Média do ciclo de trabalho (%). ANOVA two-way múltiplas comparações e teste post-hoc de Tukey's. n por grupo= 10. A composição dos grupos está de acordo com intervenção com vitamina D ou veículo e modelo de paralisia cerebral ou controle. * = CV vs. PCV; ** = CD vs PCD; $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados quatro populações de ratos machos, tendo como objetivo avaliar o efeito do tratamento neonatal com Vitamina D no desenvolvimento do sistema músculo-esquelético nesses grupos, a partir de alguns parâmetros, como indicadores murinométricos do desenvolvimento, ontogênese de reflexos, e análise da marcha em Catwalk, sendo este primeiro avaliado nos dias 7, 30 e 60 de vida.

Todos os animais submetidos a PC experimental, dos dois grupos, apresentaram uma redução de peso significativa quando comparados aos grupos controles, porém, foi observado que no grupos experimentais de PC os ratos que receberam a VitD apresentaram um aumento de peso (P7 e P30) quando comparado ao grupo que recebeu apenas o veículo, mostrando que o tratamento neonatal com VitD mitigou em partes os efeitos deletérios do modelo de PC.

Além disso, em relação aos eixos do crânio, os grupos experimentais também apresentaram uma redução nesses comprimentos em relação às medidas dos grupos controles, sendo o eixo nasoanal no P7, P30 e P60, e os eixos látero-lateral e anteroposterior no P30. Entretanto, no P60 foi evidenciado uma diferença no comprimento anteroposterior entre os grupos controles, mostrando um aumento nos animais suplementados com VitD, evidenciando um efeito positivo da suplementação desse hormônio. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Visco *et al.* (2023), no qual também foi evidenciado uma diminuição de peso corporal dos animais experimentais em relação aos do grupo controle na fase neonatal em um tratamento realizado com kaempferol, um flavonoide que possui ação antioxidante como a VitD.

Das medidas murinométricas avaliadas, destacamos a redução dos eixos nos animais dos grupos PC e a diminuição de peso dos mesmos, sugerindo que esses animais tiveram um prejuízo em relação a sua alimentação e provavelmente em seu acesso a lactação na fase neonatal, afetando consequentemente seu peso e seu crescimento (Visco *et al.*, 2023), esse modelo também poderia ter atrapalhado no processo de mastigação na fase pós-lactação onde ocorre a introdução da alimentação sólida (Lacerda *et al.*, 2017; Lacerda *et al.*, 2019), da mesma forma que

os indivíduos com esse distúrbio da PC também tendem a apresentar disfunção alimentar diretamente relacionada com baixo crescimento corporal (Fung *et al.*, 2002). Esse estudo mostrou que a anóxia perinatal junto com a restrição sensório-motora dos membros inferiores na fase neonatal afeta de forma negativa aspectos somáticos e murinométricos nos roedores, ocasionando na redução dessas medidas. Em contrapartida, é possível observar o efeito positivo exercido pela VitD, nos períodos de idades alvo de maturação somática.

A ontogênese dos reflexos envolve e espelha diretamente o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC), e por isso é um indicador da maturação física do animal (Smart & Dobbing, 1971; Fox, 1965). Os ratos dos grupos experimentais, demonstraram retardo no desenvolvimento da maioria dos reflexos analisados e retardo na maturação física quando comparados aos do grupo controle, não apresentando diferenças significativas entre os animais que receberam VitD e os que receberam veículo, evidenciando o impacto que a anóxia perinatal gera no amadurecimento do SNC.

Os testes de reflexo são ferramentas confiáveis para mostrar a maturação da mielinização, sinaptogênese e da medula espinhal, indicam o estágio do desenvolvimento neurológico e comportamental desses filhotes (Visco *et al.*, 2023), a exemplo da geotaxia negativa que é usada para avaliar a manutenção do equilíbrio geral do corpo por meio do sistema vestibular (Dupuis *et al.*, 2024). Além disso, a própria restrição sensório motora também afeta a ontogenia reflexa pós-natal pela mudança gerada no córtex motor primário (M1), que evidencia a alteração no refinamento dos circuitos espinhais nesses animais (Dupuis *et al.*, 2024; Delcour *et al.*, 2018). Demonstrando dessa forma, que os animais submetidos a PC estão suscetíveis a esse dano e que a VitD não foi capaz de atenuar esse déficit nessas condições.

Na análise de marcha, foi utilizado o sistema de análise de marcha CatWalk XT® que consiste em uma plataforma que avalia de forma comportamental roedores, e fornece dados para analisar a função motora e marcha (Hamers *et al.*, 2001). No presente estudo, foi observado que os animais dos grupos paralisia apresentaram diminuição nos parâmetros avaliados em comparação com os grupos controles, evidenciando o comprometimento motor que é comum nos indivíduos

acometidos pela paralisia cerebral, além disso, não foi registrada nenhuma diferença estatisticamente relevante nos resultados comparativos entre o PC VitD e o PC veículo.

Estes resultados, mostram o impacto que o modelo de PC combinando anóxia perinatal mais restrição sensório-motora causa nos animais, que inclusive já foi evidenciado por pesquisadores, estes, demonstraram que as alterações sofridas nas áreas periféricas e corticais são bem maiores quando comparados aos modelos que só realizam a anóxia ou somente a restrição (Coq *et al.*, 2008).

A asfixia perinatal (AP) por si só já causa alterações significativas nas articulações dos membros inferiores, afetando negativamente as cartilagens, essa degeneração pode ser o resultado de espasticidade crônica induzida pela anóxia (Coq *et al.*, 2008), mas quando usada concomitante a restrição sensório motora essa denervação pode ser associada ao desuso da atividade muscular (Lindboe & Platou, 1982; Romanini *et al.*, 1989; Zarzhevsky *et al.*, 2001). A nível cerebral, a AP está relacionada a redução da ação de alguns neurotransmissores em áreas cerebrais envolvidas no controle motor, como o núcleo estriado (Bernert *et al.*, 2003; Van de Berg *et al.*, 2003; Gross *et al.*, 2005).

Em relação a restrição sensório motora, a via somatossensorial é afetada, a alteração nos movimentos dos membros inferiores refletem no sistema nervoso imaturo já que o músculo e o SNC estão intimamente ligados, e isso gera consequências no sistema locomotor do animal (Canu *et al.*, 2019, Coq *et al.*, 2020). A VitD de forma geral tem um papel importante na saúde muscular e óssea, fazendo com que seja um fator muito importante para o sistema locomotor, como mostra os trabalhos de Lowe *et al.* (2017) e Bouillon *et al.* (2008), mas isto não foi evidenciado no nosso estudo nos parâmetros e dias avaliados.

7. CONCLUSÃO

Verificou-se que o tratamento neonatal com Vitamina D em roedores machos submetidos a Paralisia Cerebral experimental atenuou os efeitos deletérios desse modelo sobre o seu fenótipo corporal, mitigando significativamente a perda de peso desses animais nos períodos de idades alvo de maturação somática, visto que esse é um dos efeitos mais marcantes nos animais submetidos a esse modelo. Também foi possível notar que houve uma diferença no crescimento corporal entre os grupos controles, mostrando um aumento nos animais suplementados com VitD, evidenciando um efeito positivo da suplementação desse hormônio. Já em relação a maturação física, reflexos e análise de marcha, os grupos experimentais demonstraram retardo no desenvolvimento em relação aos controles, não foram evidenciadas diferenças relevantes entre os animais PCV e PCD nos parâmetros avaliados, mostrando que a VitD não foi capaz de atenuar esse déficit nessas condições.

Assim, com base nesses resultados, podemos afirmar que o tratamento neonatal com a suplementação da VitD apresenta um impacto benéfico no fenótipo corporal desses animais submetidos a PC experimental e se mostra como um potencial agente atenuador de desordens causadas por distúrbios neurológicos precoces. Porém, ainda são necessários mais estudos para entender como sua ação neuroprotetora reflete de fato no sistema locomotor.

REFERÊNCIAS

COLVER, A.; FAIRHURST, C.; FARAÓ, P. O. D. Cerebral Palsy. *The Lancet*, v. 383, n. 9924, p. 1240-1249, 5–11 abr. 2014. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61835-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61835-8).

KRÄGELOH-MANN, I.; CANS, C. Update on cerebral palsy. *Brain and development*, v. 31, n. 7, p. 537-544, ago. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2009.03.009>.

HADDERS-ALGRA, M. Early Human Motor Development: From Variation to the Ability to Vary and Adapt. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, v. 90, p. 411-427, jul. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.05.009>.

GIRGIS, C. M. *et al.* The Roles of Vitamin D in Skeletal Muscle: Form, Function, and Metabolism. *Revisões Endócrinas*, v. 34, n. 1, p. 33-83, 1 fev. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/er.2012-1012>.

BOUILLON, R. *et al.* Vitamin D and Human Health: Lessons from Vitamin D Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews*, v. 29, n. 6, p. 726–776, 1 de out. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/er.2008-0004>.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.024>.

LOWE DW. *et al.* Vitamin D improves functional outcomes in neonatal hypoxic ischemic male rats treated with *N*-acetylcysteine and hypothermia. *Neuropharmacology*, v. 123, p. 186-200, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.06.004>.

BALDEN R. *et al.* Vitamin D Deficiency Exacerbates Experimental Stroke Injury and Dysregulates Ischemia-Induced Inflammation in Adult Rats. *Endocrinology*, v. 153, n. 5, p. 2420-2435, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/en.2011-1783>.

FRONTERA WR., OCHALA J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. *Calcified Tissue Internacional*, v. 96, p. 183–195, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00223-014-9915-y>.

SADOWSKA M. *et al.* Cerebral Palsy: Current Perspectives on Definition, Epidemiology, Risk Factors, Classification, and Treatment Options. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, v. 16, p. 1505-1518, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/NDT.S235165>.

BIKLE, DD. Vitamin D and bone. *Current Osteoporosis Reports*, v. 10, p. 151-159, 2012. Disponível em: [10.1007/s11914-012-0098-z](https://doi.org/10.1007/s11914-012-0098-z).

HOULIHAN, CM., STEVENSON RD. Bone Density in Cerebral Palsy. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*. v. 20, p. 493-508, 2009. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3688475/>.

BRENT, MB. *et al.* Animal models of disuse-induced bone loss: study protocol for a systematic review. *Systematic Reviews*. v. 9, n. 185, 2020. Disponível em: 10.1186/s13643-020-01441-3.

JESSEN, KR. Glial cells. *The international journal of biochemistry and cell biology*. v. 36, e. 10, p. 1861-1867, 2004. Disponível em: 10.1016/j.biocel.2004.02.023.

VISCO, DB. *et al.* A systematic review of neurogenesis in animal models of early brain damage: Implications for cerebral palsy. *Experimental Neurology*. v. 340, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113643>.

CLOWRY G.J. *et al.* What are the best animal models for testing early intervention in cerebral palsy?. *Frontiers Neurology*. v. 5, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fneur.2014.00258>.

GOUVEIA, HJCB. *et al.* Maternal exposure to busulfan reduces the cell number in the somatosensory cortex associated with delayed somatic and reflex maturation in neonatal rats. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.101710>.

VISCO, DB. *et al.* Neonatal kaempferol exposure attenuates gait and strength deficits and prevents altered muscle phenotype in a rat model of cerebral palsy. *International Society for Developmental Neuroscience*. v. 83, e. 1, p. 80-97, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jdn.10239>.

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

DUPUIS, O. *et al.* Early movement restriction affects the acquisition of neurodevelopmental reflexes in rat pups. *Brain Research*, v. 1828, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2024.148773>.

MENÉNDEZ SG, MANUCHA W. Vitamin D as a Modulator of Neuroinflammation: Implications for Brain Health. *Current Pharmaceutical Design*, v. 30, n. 5, p. 323-332, 2024. Disponível em: 10.2174/0113816128281314231219113942.

WEST-EBERHARD MJ. *Developmental plasticity and evolution*. e. 1. Oxford University Press. 2003.

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

FRANCISCO EL HOMBRE. Triste, Louca ou Má. Intérprete: Francisco el Hombre. Compositores: Juliano Ribeiro Salgado, Mateo Piracés-Ugarte. Gravadora: Tratore, 2016. Faixa 1 do álbum Soltasbruxa.

ANEXO A – Comprovante de submissão e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFPE/CCB)



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biotecnologias
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: 2126 8842
ceua@ufpe.br

Recife, 02 de maio de 2022

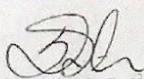
Ofício nº 21/22

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Ana Elisa Toscano da Silva Castro**
Centro Acadêmico de Vitória
Núcleo de Enfermagem / Anatomia
Processo nº **104/2021**

Certificamos que a proposta intitulada "Plasticidade fenotípica: tratamento neonatal com vitamina D em ratos de ambos os sexos submetidos a paralisia cerebral experimental". **Registrado com o nº 104/2021** sob a responsabilidade de **Prof. Ana Elisa Toscano da Silva Castro** o que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 26/04/2022

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	28/04/2022 a 28/12/2025
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus albinus</i> , linhagem Wistar (Rato heterogênico)
Nº de animais	179
Peso/Idade	idade: adultos (90 a 120 dias) e neonatos peso adultos: 220 a 250 g peso neonatos: ~06g a ~250g
Sexo	Machos – 81 (17 adultos e 64 neonatos) Fêmeas – 98 (34 adultos e 64 neonatos)
Origem: Biotério de Criação	Biotério de criação do Departamento de Nutrição da UFPE.
Destino: Biotério de Experimentação	Biotério do Departamento de Nutrição

Atenciosamente


 Prof. Sebastião R. F. Silva
 Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691